

THESIS

MINISE

1968

**Zur Wirkungsspezifität biogener Chinone
bei der oxydativen Phosphorylierung**

Untersuchungen am perfundierten Froschherzen

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

BERND / SCHOTTDORF



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153307_0026

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Th. Bücher

Zur Wirkungsspezifität biogener Chinone bei der
oxydativen Phosphorylierung
Untersuchungen am perfundierten Froschherzen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernd S c h o t t d o r f
aus München

München 1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Doiz. Dr. E. Meyer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Th. Bücher
Dekan:	Prof. Dr. F. Holle
Tag der mündlichen Prüfung:	13.2.1968

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Erich M e y e r in der Zeit von Oktober 1962 bis Februar 1967 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Theodor B ü c h e r danke ich für die großzügige Überlassung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Correferates.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. Peter K a r l s o n für die wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. Erich M e y e r möchte ich für die Überlassung des Themas, für sein großes Interesse an dem Fortgang der Arbeit und die vielen Anregungen und Diskussionen sehr herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
Aufbau der Atmungskette	5
Oxydative Phosphorylierung	7
Biogene Chinone	9
Funktion in Atmungskette und oxydativer Phosphorylierung	9
Experimentelle Ergebnisse	11
<u>Ergebnisse</u>	17
Arbeiten mit überlebenden Organen (Prinzip)	17
Wirkungen von K-Vitaminen am hypodynamen Herzen	18
Wirkung von α -Tocopherol	19
Wirkung von ATP	20
Morphologischer Zustand	20
<u>Methodik</u>	22
<u>Methoden zur Chinonbestimmung</u>	26
Extraktionsmethoden	26
Trennmethoden	27
Chinonnachweis auf Chromatogrammen	30
Messmethoden für Chinone	32
Darstellung der wichtigsten Chinonbestimmungsver- fahren	35
Chinonkonzentrationen verschiedener biologischer Systeme	37
Experimentelle Schwierigkeiten der Ubichinon- analytik	37
<u>Bestimmung von Ubichinon in Herzmuskelgewebe</u>	46
A. Voruntersuchungen (Kalbsherz)	46
a) Gewebeextraktion	46
b) Chromatographie des Gewebeextraktes	47
c) Erfassung von reduziertem Ubichinon	52
d) Recovery-Versuch über die Einzelsysteme	55

	Seite
B. Methodik zur Ubichinonanalyse (zusammenfassende Beschreibung)	57
C. Kriterien für die quantitative und spezifische Durchführbarkeit der modifizierten Ubichinon- analyse	61
1. Extraktion aus dem Gewebe	61
2. Identität und Reinheit der Ubichinonfraktion	62
3. Recovery-Versuch	69
<u>Ergebnis der Ubichinonanalyse in Abhängigkeit vom Aufarbeitungsgang</u>	71
<u>Gehalt des Froschherzens an Ubichinon₅₀</u>	75
<u>Einfluss von Ubichinon₅₀ und Ubichinon₃₀ auf die isotonische Kontraktion des hypodynamen Froschherzens</u>	80
<u>Diskussion</u>	85
<u>Zusammenfassung</u>	88
<u>Literaturverzeichnis</u>	89

EINLEITUNG

=====

Die Aufklärung chemischer Vorgänge in der lebenden Zelle schreitet mit wachsender Geschwindigkeit fort. Schon heute überblicken wir eine Vielzahl von Prozessen, die in gegenseitiger Abhängigkeit, gleichzeitig nebeneinander auf engstem Raum ablaufen. So werden anabole Prozesse zur Bereitstellung der zum Wachstum und zum laufenden Ersatz funktioneller Zellbestandteile notwendigen Substanzen beschritten, neben katabolen Reaktionswegen, die der Energiegewinnung und dem Abbau von Stoffwechselprodukten dienen. In vielen Fällen bestehen enge Zusammenhänge zwischen anabolen und katabolen Mechanismen. Carbamylphosphat z.B. kann einerseits über den Harnstoffzyklus zur Stickstoffausscheidung verwendet werden, andererseits zum Aufbau der Pyrimidin-Nukleotide dienen. Alternative Wege des Kohlenhydratstoffwechsels sind der Abbau über das Embden-Meyerhof-System und der Aufbau aus Lactat bzw. verschiedenen Aminosäuren im Rahmen der Glukoneogenese. Die einzelnen biochemischen Funktionen sind den Bedürfnissen der Einzelzelle und des Gesamtorganismus genauestens angepasst.

Zur Regulation dieser Vorgänge werden die Enzymsysteme beeinflusst, die die Stoffwechselprozesse katalysieren. Es kann sowohl die Enzymaktivität, als auch die Enzymmenge variiert werden. Die Aktivität der Enzyme verändert sich unter dem Einfluß von Hemmungsmechanismen, z.B. isosterisch oder allosterisch durch die Produkte des katalysierten Vorganges. Die Menge des für eine Reaktion zur Verfügung stehenden Enzyms ist von der Steuerung der Enzymproduktion abhängig. Hierbei spielt das Repressorsystem eine wesentliche Rolle.

Monod (1) unterscheidet bei Bakterien zwischen konstitutiven und adaptiven Enzymen. Die konstitutiven Enzyme bilden die immer vorhandene enzymatische Grundlage des Bakterienstoffwechsels. Adaptive Enzyme dienen der Anpassung an besondere Bedingungen. Z.B. werden bei *E. Coli* β -Galactosidase und Galactosidpermease nur gebildet, wenn in dem Nährboden Lactose vorhanden ist. Die Enzymsynthese wird von der Lactose induziert durch Ausschaltung des Repressors, der die Funktion des sog. "Lac-Operons" kontrolliert.

Die genannten Mechanismen ermöglichen der Zelle die Erfüllung

ihrer Aufgaben unter Wahrung größtmöglicher Ökonomie und die Anpassung an wechselnde Bedingungen.

Der geregelte Ablauf derartig komplizierter Prozesse erfordert eine funktionelle Differenzierung der Zelle in morphologisch fassbare Untereinheiten. Es handelt sich um zwei Prinzipien: die Zellkompartimentierung und die Bildung von morphologischen Strukturen.

Die Zelle ist erstens aufgeteilt in verschiedene Zellkompartimente. Im Zellkern ist das genetische Material in Form der DNS lokalisiert, welche über die Bildung der sogenannten "Messenger-RNS" auf die Enzymsynthese im Zytoplasma einwirkt. Im Zytoplasma sind verschiedene lösliche Enzymsysteme nachzuweisen z.B. die Enzyme der Glykolyse. Das endoplasmatische Retikulum ist ein Membransystem, welches in seinem Innenraum das Ergastoplasma vom übrigen Cytoplasma abtrennt.

Das zweite Prinzip der funktionellen Differenzierung ist die Bildung von morphologischen Strukturen. Insbesondere handelt es sich um Membransysteme, die einerseits der Abteilung der Zellkompartimente, andererseits der Anordnung von Enzymen dienen.

Struktur biologischer Membranen

Die meisten intrazellulären Membranen scheinen nach einem Prinzip aufgebaut zu sein (2 , S. 211). Dieses soll am Beispiel der mitochondrialen Strukturen erläutert werden. Die folgende Zusammenfassung der neueren Ergebnisse hält sich an die Angaben von Lehninger (2):

Die Mitochondrien bestehen aus einer Hüllmembran, den Cristae mitochondriales, die das Mitochondrion in einzelne Kammern aufteilen und der Matrix, dem unstrukturierten Innenraum.

Chemische Analyse der Membranen ergibt 35-40 % Lipide und 60-65 % Protein. Die Lipide bestehen zu 90 % aus Phospholipid. Die sehr konstanten Relationen der einzelnen Lipide zueinander werden als Voraussetzung der thermodynamischen Stabilität der Lipidschicht in der Mitochondrienmembran angesehen. Die Proteine der Membran setzen sich aus Strukturproteinen und Enzymproteinen

zusammen. Letzteres macht 25 % der Membran-Proteinmenge aus. Daneben wird noch Actomyosin gefunden, welches mit den Volumen-änderungen der Mitochondrien unter verschiedenen Funktionsbedingungen in Zusammenhang gebracht wird.

Wie aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen hervorgeht, sind die Membranen aus Proteinen und Lipiden schichtartig aufgebaut. Die Grundlage der Membran bildet eine Doppelschicht aus Lipidmolekülen, deren unpolare Kohlenwasserstoffketten nach innen angeordnet sind, wo sie eine einheitliche, hydrophobe Phase bilden. Die polaren Gruppen sind nach außen gerichtet. Die Lipiddoppelschicht ist an jeder Seite von einer Proteinschicht bedeckt, dem sogenannten Strukturprotein.

Die Versuche von Lenninger mit künstlichen Membranen (3) an denen die physikalischen und chemischen Eigenschaften, z.B. die Bedingungen für die thermodynamische Stabilität dieser Membranen untersucht werden können, lassen einen Einblick in weitere Einzelheiten erwarten.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen sprechen dafür, daß der Membran auf beiden Seiten sogenannte Elementarkörperchen reihenweise aufgelagert sind (4), runde Strukturen, die mit einem dünnen Stiel an der Membran befestigt sind. Die Zuordnung dieser morphologischen Einheiten (Repeating Units) zu Funktionen der Mitochondrien gelang Green (4). Es handelt sich um die Enzymkomplexe des elektronentransportierenden Systems (siehe unten).

Die Mitochondrien sind in erster Linie die Organellen des Energiestoffwechsels. Die Energie wird durch die Oxydation des Wasserstoffs mit atomarem Sauerstoff gewonnen. Die Bildung von 1 Mol H_2O aus DPNH und $1/2 O_2$ liefert 52 kcal. Ein Teil dieser Energie (21 kcal) wird durch die Bildung von 3 Mol ATP aus ADP + anorganischem Phosphat in chemischer Bindung gespeichert. Diese Kopplung von ATP-Bildung und Wasserstoff-Oxydation wird als oxydative Phosphorylierung bezeichnet.

Der hohe Wirkungsgrad der Energiespeicherung (40 %) wird durch die Aufteilung des Gesamtvorganges in eine Reihe von Reaktionsschritten ermöglicht. Der Wasserstoff wird über die Enzyme der Atmungskette schrittweise dem Sauerstoff zugeführt. Die

Aufteilung in Einzelschritte führt zu einem für die Atmungskette spezifischen Problem. Während z.B. beim Abbau der Glucose im Embden-Meyerhof-System bei jedem Schritt ein neues Zwischenprodukt gebildet wird, welches von einem spezifischen Enzym weiter umgesetzt werden muß, ändert sich das Substrat der Atmungskette, der Wasserstoff bei Durchlaufen des Systems nur durch seinen Energiegehalt. An einem im Plasma gelösten Enzymsystem würde daher der Wasserstoff auf dem kürzesten Weg zum Sauerstoff geführt. Einige der zwischengeschalteten Enzymsysteme würden übersprungen und die Ausnutzung der Verbrennungsenergie zur ATP-Bildung könnte nicht mehr mit optimalem Wirkungsgrad stattfinden.

Diese Schwierigkeit wird dadurch umgangen, daß das System der Atmungskette in den Mitochondrien in Form von strukturgebundenen Enzymen lokalisiert ist. Der feste Einbau der Enzymmoleküle in die Membranstruktur führt tatsächlich zu der notwendigen Modulation der Enzymfunktion. Dies wird deutlich bei dem Versuch, isolierte Elemente des elektronen-transportierenden Systems zu studieren. Aus der natürlichen Sequenz der Elektronenträger herausgelöste Enzymmoleküle sind in ihrer Aktivität und ihrer Spezifität gegenüber physiologischen und künstlichen Elektronendonatoren und Akzeptoren verändert (35).

Der Vorteil der Bindung von Enzymmolekülen an Strukturen liegt also erstens in der Möglichkeit, die Fermente ganzer Reaktionsketten räumlich zusammenzuordnen und dadurch den Transport eines Substrates zu kontrollieren. Hierbei ist die Brown'sche Molekularbewegung als umsatzlimitierender Faktor ausgeschaltet und es ergibt sich eine optimale Ausnutzung der Enzymkapazität. Darüberhinaus können asymmetrisch gebaute Enzymmoleküle bei sterischer Fixierung an die Membran zur räumlich gerichteten Abgabe ihrer Reaktionsprodukte veranlasst werden, was für Konzentrationsarbeit, etwa im Rahmen der Ionentransportmechanismen der Mitochondrien von Bedeutung ist.

Die Untersuchung der Mechanismen der Atmungskette und oxydativen Phosphorylierung wird durch die Strukturabhängigkeit der beobachteten Vorgänge wesentlich erschwert. Bisher fehlen adäquate Methoden zu ihrer Erforschung. Daher sind unsere

Kenntnisse auf diesem Gebiet nicht soweit fortgeschritten, wie es im Bereich der löslichen Enzyme, z.B. des Embden-Meyerhof-Systems möglich war.

Aufbau der Atmungskette

Unter Berücksichtigung neuer Ergebnisse von Green (4), die an Mitochondrien aus Rinderherz und Rinderleber gewonnen wurden, läßt sich das Elektronen-transportierende System folgendermaßen beschreiben:

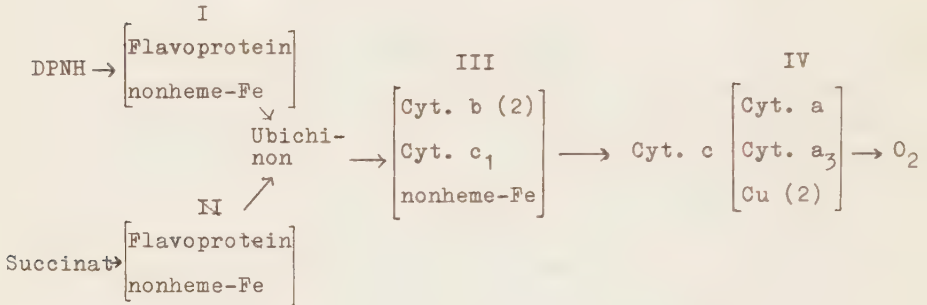
Es ist gelungen, die Fermentsysteme der Atmungskette in 4 Untereinheiten, die sogenannten Komplexe, aufzuteilen (siehe Tab. 1), die durch Einwirkung von Cholaten voneinander getrennt werden können. Die Komplexe sind Teile der Repeating Units der Mitochondrienmembran bzw. der Elementarpartikel (5). Sie bestehen aus Enzymprotein, Strukturprotein und Phospholipiden. Sie haben die Neigung, sich nach Entfernung des Cholates zu Membranen zusammenzuschließen. Dies erfordert die Anwesenheit des bei der Cholatbehandlung entfernten Phospholipids.

Die Membranbildung erfolgt sowohl zwischen gleichartigen Komplexen, als auch zwischen den Komplexen der vier verschiedenen Kategorien. Werden die vier Komplexe gemeinsam zur Rekonstruktion gebracht, so kombinieren sich bevorzugt die in der Sequenz des Elektronentransportes zusammengehörigen Partner.

Die enzymatischen Komponenten der Komplexe wurden durch Elektrophorese auf Polyacrylamidgel aufgetrennt. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die mitochondriale Atmungskette entsprechend dem Schema der Tab. 1 dargestellt werden.

Die Tabelle zeigt die Flavoprotein und nonheme-Fe enthaltenden Komplexe I und II, welche den Wasserstoff von DPNH bzw. Succinat übernehmen. Der Elektronentransport zu dem von beiden Komplexen beschickten Komplex III wird von Ubichinon vermittelt. Von dort führt der Weg über Cytochrom c und den Komplex IV zum Sauerstoff.

Tab. 1: Aufbau der mitochondrialen Atmungskette nach Green (4). Die Komplexe oder Untereinheiten sind durch römische Zahlen gekennzeichnet. Erläuterungen im Text.



Wie die Tabelle zeigt, sind die Komplexe aus einer definierten Anzahl von Enzymmolekülen zusammengesetzt. Z.B. enthält Komplex III: 2 Moleküle Cytochrom b, 1 Molekül Cytochrom c₁, 1 Molekül nonheme-Fe, 3-4 Moleküle Strukturprotein.

Auch die Arbeiten von Green lassen eine Reihe von Fragen offen: So ist nicht restlos geklärt, welchen Weg die Elektronen innerhalb der Komplexe nehmen. Einige Details sind zwar gesichert, z.B. lautet die Sequenz der Enzyme in Komplex III: [Cytochrom b]₂--nonheme-Fe -- Cytochrom c₁. Hier ist jedoch u.a. nicht gesichert, wie die beiden Cytochrom b-Moleküle zueinander in Beziehung stehen. Die Zuordnung von Cytochrom a zu Cytochrom a₃ und von beiden zu den Kupferproteinen in Komplex IV sind nicht bekannt. Es bestehen außerdem Unklarheiten bezüglich der eisenhaltigen Proteine der Komplexe I und II.

Die Molekulargewichte der Elektronen-transportierenden Enzyme sind geringer, als vor Abtrennung des Strukturproteins erwartet worden war. Sie betragen zwischen 12 000 und 38 000.

Das neben den enzymatischen Komponenten in den Komplexen enthaltene Strukturprotein wird zum Elektronentransfer nicht unbedingt benötigt. Es hat aber die Funktion, ein stabilisierendes Rückgrat der respiratorischen Enzymeinheiten zu bilden.

Zusammenspiel der Funktionseinheiten

Die exakte Aneinanderlagerung der Komplexe entsprechend der Sequenz des Elektronentransportes wird nicht als notwendig erachtet, da der Transport zwischen ihnen durch lipidlösliche "Shuttle-Molecules" vermittelt wird, die sich in der Lipidphase der Membran extrem schnell bewegen können. Als diese "Shuttle-Molecules" werden angesehen: Co-Enzym q (Ubichinon) (zwischen Komplex I bzw. II und Komplex III), sowie Cytochrom c (zwischen Komplex III und Komplex IV). Die Konzentrationen dieser Moleküle sind nicht limitierend für den Durchsatz. Der limitierende Schritt des Elektronentransports besteht vielmehr in der Elektronenübertragung von Wasserstoff-Donatoren (DPNH und Succinat) auf die Atmungskette.

Oxydative Phosphorylierung

Wesentlich geringer als unsere Kenntnisse über den Aufbau der Atmungskette ist das Wissen über den Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung. (Abb. 1)

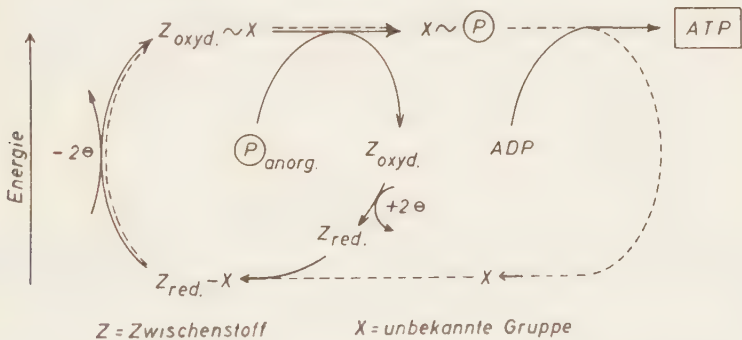
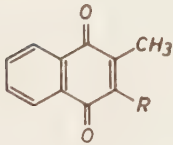


Abb. 1: Die mutmaßliche Bedeutung von Zwischenträgern für Phosphat im Rahmen der oxydativen Phosphorylierung. Nach Lehninger (6, 7) aus Karlson, Lehrbuch der Biochemie.

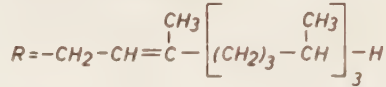
Wie das obige Schema zeigt, muß die Bildung von ATP in zwei Stufen ablaufen (Lehninger (6, 7)). Der Phosphatakzeptor X würde nach seiner Bindung an einen Zwischenträger Z durch Oxydation auf ein höheres Energieniveau gebracht. Nun bildet sich eine

Natürlich vorkommende Chinonverbindungen im tierischen Organismus.

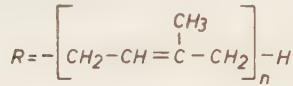
Vitamin K



Vitamin K₁ (Phyllochinon):



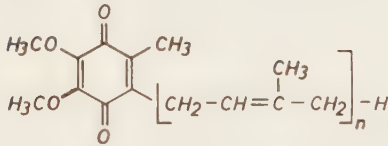
Vitamin K₂:



Vitamin K₃ (Menadion):

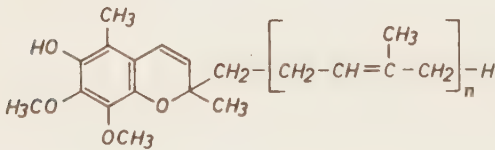


Ubichinon



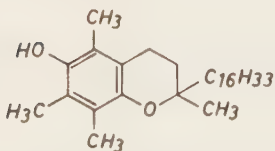
Ubichinon₅₀: n = 10

Ubichromenol

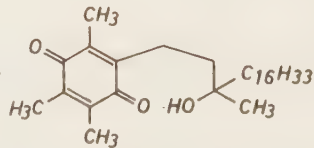


Ubichromenol₅₀: n = 9

α-Tocopherol



DL-α-Tocopherol



α-Tocopherylchinon

energiereiche Bindung zwischen X und anorganischem Phosphat, welches anschließend auf ATP übertragen werden kann. An den drei Phosphorylierungsschritten der Atmungskette müßte aus energetischen Gründen jeweils ein anderer Zwischenträger für energiereiches Phosphat teilnehmen.

Die Aufklärung des Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung setzt erstens voraus, die Enzymsysteme zu isolieren, die die Bildung des energiereichen Zwischenproduktes katalysieren. Derartige koppelnde Faktoren konnten von verschiedenen Autoren nachgewiesen werden (Lehninger u. Ishikawa (8)). Die Reindarstellung und die Aufklärung des Mechanismus des Zusammenspiels mit den Enzymen des Elektronentransportes sind jedoch noch in keinem Fall gelungen. Zweitens müßten die energiereichen Phosphat-Zwischenverbindungen nachgewiesen werden.

Biogene Chinone

Bei den Überlegungen über die chemische Natur des Zwischenträgers spielen seit 1953 (Martius (9)) verschiedene biogene Chinone eine wichtige Rolle (Formeln s.S.8). Diese könnten darüber hinaus mit ihrem Redoxsystem auch in den Elektronentransport eingeschaltet sein.

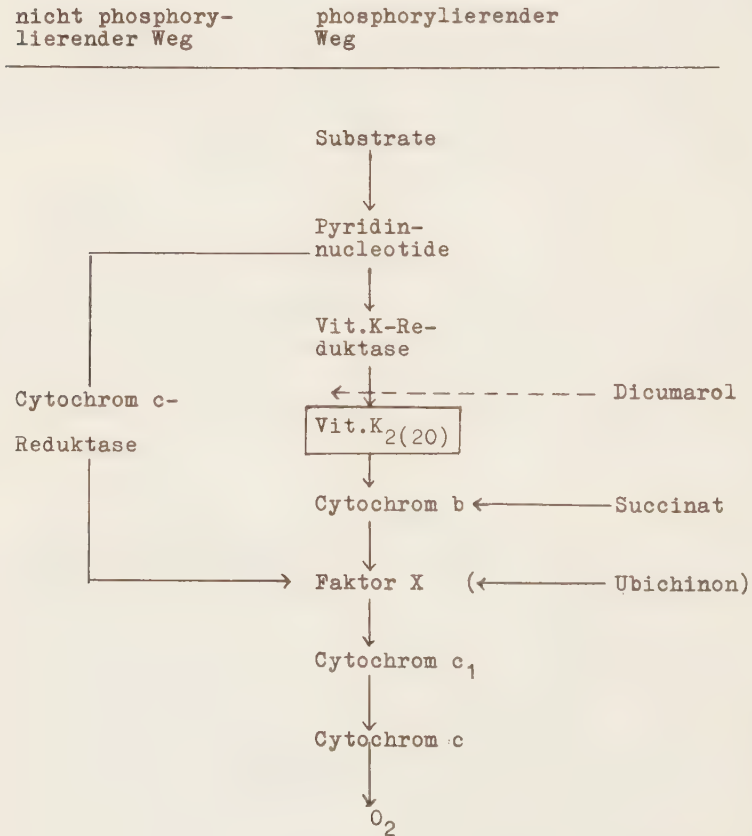
Vitamin K

Aufgrund der chinoiden Struktur des Methylnaphthochinonkernes könnte Vitamin K als Redoxsystem wirken. Nach Ansicht von Martius (11) ist die biologisch aktive Form das Vitamin K₂ mit ungesättigter isoprenoider Seitenkette. Auch als Zwischenträger für energiereiches Phosphat wäre das Methylnaphthochinonsystem geeignet. Hierbei käme es zur Bildung von Chinolphosphaten, welche das energiereich gebundene Phosphat auf ADP übertragen könnten.

Tabelle 2 stellt die Position von Vitamin K in der Atmungskette nach den Ansichten von Martius (11) dar. Aus dem Schema geht hervor, daß das Vitamin K und die zugehörige Vitamin K-Reduktase in den Abbauweg eingeschaltet sind, der vom DPNH zu dem Faktor X (Ubichinon) führt. Die Kopplung der oxydativen Phosphorylierung an den Oxydationsweg DPNH-Faktor X ist nur mit Hilfe des intakten Vitamin K-Systems (Vitamin K-Reduktase, Vitamin K₂ (20 c)) mög-

lich. Wird der Weg durch Dicumarol (einen Vitamin K-Antagonisten) blockiert, oder fehlt das Vitamin K, so werden die Elektronen über eine nicht phosphorylierende Cytochrom c-Reduktase transportiert.

Tab. 2: Schema über die Position des Vitamin K in der Atmungskette nach Martius (11).



Ubichinon

Die biologisch wirksame Form des Ubichinons ist das Ubichinon₅₀ mit einer Seitenkette aus 10 Isoprenresten. In Rattenherz wurde auch Ubichinon₄₅ nachgewiesen. Bezüglich seiner möglichen Rolle als Redoxkatalysator und Zwischenträger für energiereiches Phosphat ist es mit den K-Vitaminen vergleichbar.

Die Stellung des Ubichinons in der Atmungskette geht aus dem Schema von Green (Tab. 1) hervor. Wie auf S.5 ausgeführt wurde, vermittelt Ubichinon₅₀ den Elektronentransport von den Komplexen I und II auf den Komplex III.

Für eine Beteiligung des Ubichinons an der oxydativen Phosphorylierung gibt es bisher keine Anhaltspunkte. Auf Grund seiner Stellung in der Atmungskette müßte es an dem zweiten Phosphorylierungsschritt teilnehmen, denn dieser liegt zwischen Flavoprotein und Cytochrom c.

α - Tocopherol

Die Tocopherole müßten, um an den Redoxvorgängen teilzunehmen, in das Tocopherylchinon übergehen. In den Elektronentransport wäre dann das Redoxpaar Tocoquinon - Tocohydrochinon eingeschaltet (12, 13, 14).

Experimentelle Ergebnisse

Zahlreiche experimentelle Ergebnisse sprechen für die Beteiligung von Chinonen an den Vorgängen des Energiestoffwechsels. Nach Slater (10) müssen für eine derartige Funktion folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. "The component must be present in amounts commensurate with the enzyme activity.
2. Removal of the component must result in loss of activity, and the activity must be restored on addition of the component.
3. The component must undergo oxidation and reduction during electron transfer at a rate commensurate with the overall enzyme activity."

Bei keinem Chinon ist es bisher gelungen, alle Kriterien von Slater zu erfüllen. Zwar scheint dies nicht unbedingt notwendig, denn z.B. wäre die Theorie der schnell beweglichen "Shuttle Molecules" (Green u. Tzagoloff (4)) eine Erklärung, warum das energieliefernde System mit einer so geringen Menge an Vitamin K auskommt (s. unten). Wie die folgende Darstellung der experimentellen Ergebnisse jedoch zeigt, bestehen noch viele Unklarheiten, die es nicht gestatten, eine endgültige Aussage über die Rolle der Chinone in der Atmungskette und oxydativen Phosphorylierung zu machen.

Vitamin K

Den ersten experimentellen Nachweis über die Teilnahme eines Chinons an den Vorgängen des Energiestoffwechsels erbrachte Martius 1954 (9), der bei Vitamin K-Mangelkücken eine Erniedrigung des P/O-Quotienten der Lebermitochondrien um 30 % fand. Durch Verfütterung von Vitamin K₁, sowie durch Zugabe des Chinons zu Suspensionen von Lebermitochondrien in vitro (15) konnte der P/O-Quotient wieder erhöht werden. Hiermit wäre die zweite Forderung von Slater erfüllt (s. oben). Martius gelang außerdem die Isolierung einer Vitamin K-Reduktase (16). Gegen diese Ergebnisse wurden jedoch Einwände vorgebracht. Crane (17) stellte fest, daß Vitamin K in tierischem Gewebe mit chemischen Methoden nicht fassbar ist. Auch die Spezifität der Vitamin K-Reduktase wurde in Zweifel gezogen, da nachgewiesen werden konnte, daß der Wasserstofftransport mit Hilfe dieses Enzyms auch auf unphysiologische Akzeptoren gelenkt werden kann (18).

Ubichinon

Das von Morton (19) und Crane (20) gleichzeitig entdeckte Ubichinon wird als Bestandteil des Elektronen-transportierenden Systems angesehen. Dafür spricht zunächst die intrazelluläre Verteilung der Substanz. Der überwiegende Teil des Ubichinons wird in den Mitochondrien gefunden. Es konnte in allen bisher untersuchten Mitochondrien nachgewiesen werden (21).

Zur Untersuchung der Folgen einer Verarmung an Ubichinon wurde versucht, dieses durch Lösungsmittelextraktion aus Mitochondrien

bzw. Elektronen-transportierenden Herzmuskelpräparationen (Keillin-Hartree-Präparation oder ETP (Elektron Transport Particles, (Green (5)) zu entfernen. Dies führte zu widersprüchlichen Ergebnissen:

So verwendete Crane (22) isooktanextrahierte Electron-Transport-Particles, deren Succinöxydase-Aktivität herabgesetzt war. Ubichinon war in der Lage, die Aktivität wieder herzustellen. Der Effekt zeigte große Spezifität, insofern, als Vitamin K₁ und α -Tocopherylchinon sich als unwirksam erwiesen. Es fand sich kein Anhalt, daß Ubichinon auch in die DPNH-Kette eingeschaltet ist (s. aber Szarkowska (21)).

Wiss u.a. (23) wiesen am Beispiel der Succinat-Cytochrom c-Reduktase, einer Präparation, welche den Wasserstoff von Succinat auf Cytochrom c überträgt, nach, daß Ubichinon aus Schweineherz (wahrscheinlich Ubichinon₅₀) und Dihydro-Ubichinon-Acetat gleich wirksam waren. Außerdem ergab sich eine Reaktivierung mit Squalen, Phytol u.a. (24). Dies schien gegen eine Wirkung von Ubichinon als Redoxsystem zu sprechen und wies auf eine strukturbildende Wirkung des isoprenoiden Systems in der Mitochondrienmembran hin.

Neuere Versuche von Szarkowska (21) an pentanextrahierten Rinderherzmitochondrien zeigen eine Reaktivierung der DPNH- und der Succinooxydase-Aktivität (Komplex I, III und IV bzw. II, III u. IV in der Atmungskettenpräparation nach Green (4)) durch Ubichinon₅₀. Vitamin K₁, α -Tocopherol und α -Tocopherylchinon waren unwirksam.

Bereits 1958 wurden von E.R. Redfearn und A.M. Pumphrey (25) grundsätzliche Einwände gegen die Aussagekraft der Isooktanextraktion von mitochondrialen Präparationen vorgebracht. Es konnte nachgewiesen werden, daß Isooktan in den Strukturen emulgiert zurückgehalten wird und die Funktion beeinträchtigt.

Crane (26) entfernte daher das Isooktan durch Ultrazentrifugation. Bei den hierbei erhaltenen Präparationen wirkte aber der Zusatz von Cytochrom c stärker reaktivierend als der von Ubichinon. Letzteres war ohne zusätzlichen Effekt, wenn bereits Cytochrom c zugegeben war. Ähnliche Versuche wurden von Lester und Fleischer (27) beschrieben. Nach Extraktion von Rinder-

herzmitochondrien mit Aceton gelang eine teilweise Reaktivierung der Succinoxidase-Aktivität durch Ubichinon, völlige Wiederherstellung war nur mit Zusatz von Cytochrom c möglich.

Daß bei Untersuchungen an lösungsmittel-extrahierten Partikeln mit je nach Arbeitsweise verschiedenen Ergebnissen gerechnet werden muß, zeigen Arbeiten von Marinetti u.a. (28). Das mit Isooctan extrahierte Material aus Schweineherz konnte durch Chromatographie an Kieselsäure als ein Gemisch aus drei bis vier Lipidkomponenten identifiziert werden. Es handelte sich um Fettsäuremonoester, teilweise um Ketoester. Die Entfernung dieser Stoffe muß zu einer weitgehenden Veränderung der mitochondrialen Struktur führen. Bei Wiederherstellung der mitochondrialen Funktion durch Substitution extrahierter Stoffe kann daher nicht gesagt werden, ob ein fehlender Stoff ersetzt, ob eine Struktur wieder aufgebaut oder ob störendes Lipidlösungsmittel vom Ort seiner Wirkung verdrängt wurde.

Daher ist der direkte spektroskopische Nachweis von Redoxreaktionen des Ubichinons von besonderem Interesse. An intakten Mitochondrien konnte die Reduzierbarkeit des mitochondrialen Ubichinons mit Substraten und Oxydierbarkeit durch O_2 nachgewiesen werden (29, 30, 31). Der Redoxgrad des Ubichinons entsprach dem Verhalten der übrigen Atmungsketten-Komponenten, die Redoxvorgänge sind mit den bekannten Inhibitoren der Atmungskette wie Amytal, Rotenon, Oligomycin u.a. hemmbar.

α - Tocopherol

Von den übrigen Chinonen des tierischen Organismus kommt noch α -Tocopherol für eine Rolle im Rahmen der energieliefernden Stoffwechselprozesse in Frage (12, 13, 14). Die Mitochondrien Vitamin E-frei ernährter Tiere zeigen eine teilweise Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung, was in einem Anstieg des O_2 -Verbrauchs und Abfall des P/O-Quotienten sichtbar wird. Den Untersuchungen über die reaktivierende Wirkung von α -Tocopherol an lösungsmittel-extrahierten Partikeln (32, 33, 34) haften dieselben Zweifel an, wie sie bei den entsprechenden Untersuchungen über Ubichinon dargestellt wurden.

Chinolphosphate

Um die Möglichkeit der Beteiligung von Chinolphosphaten bei der oxydativen Phosphorylierung zu prüfen, stellten verschiedene Autoren Schemata der denkbaren Reaktionsmechanismen auf. Besondere Beachtung verdient das Schema von Vilkas u. Lederer (34a).

Aus dem ersten Isoprenrest der Seitenkette des Chinons bildet sich unter Einbeziehung eines Teils des chinoiden Systems ein Pyranring. Die Methylgruppe in 2-Stellung geht in eine Methin-
gruppe über, die den primären Phosphatakzeptor darstellt. Nach intramolekularer Umlagerung des Phosphats in die 1-Stellung wird der Chroman-Ring geöffnet und unter Oxydation der Verbindung wird der Phosphatrest auf ADP übertragen.

Relativ einfach scheinen die Ergebnisse gewonnen, die zum Nachweis der Teilnahme des Ubichinons an den Redoxvorgängen des Elektronentransports führten (29, 30, 31), wenn man vergleicht, wie schwierig die Überträgerfunktion von Chinonen für energie-reiches Phosphat zu beweisen ist.

Die bisherigen Hinweise sind spärlich und indirekt. Die Ergebnisse von Martius (9, 11, 15, 16) auf dem Gebiet der K-Vitamine und die Arbeiten von Victor, Houchin et al. und Martius (12, 13, 14) über α -Tocopherol zeigen lediglich eine Beeinflussung der oxydativen Phosphorylierung durch die Vitamine E und K.

Kröger (35) vermutet sogar, die Möglichkeit einer Beteiligung von Ubichinon an der oxydativen Phosphorylierung sei auszuschließen. Nach seiner Ansicht müßten nämlich im kontrollierten Status der Atmungskette 20 % des Ubichinons in Form einer von Ubichinon_{ox} und -_{red} verschiedenen Verbindung vorliegen. Dies wurde durch direkte spektroskopische Untersuchung von Kröger ausgeschlossen.

Dagegen ist jedoch einzuwenden, daß die Konzentration der phosphorylierten Zwischenstufen der oxydativen Phosphorylierung durch die Gleichgewichtslage der Reaktion ähnlich gering gehalten sein könnte, wie es bei der Substratketten-Phosphorylierung der Glykolyse geschieht. Das Zwischenprodukt dieser Reaktion (1,3-Glycerophosphat) würde wegen seines hohen Energiegehaltes sehr schnell zerfallen. Daher wird diese Stufe sehr schnell

durchlaufen und **ist** unter physiologischen Bedingungen chemisch nicht fassbar.

Bewiesen wäre die Zwischenträgerfunktion der Chinone für energiereiches Phosphat erst durch die Isolierung einer Chinon-Phosphat-Verbindung aus Mitochondrien. Auch die Bildung von ATP in Mitochondrien aus zugesetzten Chinolphosphaten und ADP (36) ist nicht beweisend. Derartige Phosphatübertragungen können mit Ausbeuten von 10 - 20 % in vitro auch in Abwesenheit von Mitochondrien erreicht werden (37, 38, 39) und auf unspezifischen Mechanismen beruhen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei den bisherigen, für unsere Vorstellung über die biologische Funktion der Chinone grundlegenden Arbeiten die strukturbedingte Sonderstellung der mitochondrialen Atmungskette gegenüber löslichen Enzymsystemen nicht genügend berücksichtigt wurde. Insbesondere sind Methoden der Lösungsmittlextraktion zur Entfernung der Chinone aus dem Enzymsystem von zweifelhafter Bedeutung, denn sie schädigen die mitochondrialen Membranen universell. Es kann daher noch keine Aussage über Bedeutung und Wirkungsspezifität der Chinone im Elektronentransport und ihre Funktion als Zwischenträger für energiereiches Phosphat in der oxydativen Phosphorylierung gemacht werden.

ERGEBNISSE =====

Dohrn (40) und Asbeck (41) erarbeiteten eine Methode zur langzeitigen Perfusion überlebender Froschherzen, die es gestattet, die Chinonkonzentration auf physiologische und damit strukturschonende Weise zu senken. In den extracorporal schlagenden Organen, die mit brennstofffreier Tyrodelösung perfundiert werden, herrscht eine überwiegend katabole Stoffwechsellage. Hierbei werden zur Deckung des Energiebedarfs zell-eigene Substanzen herangezogen und niedermolekulare Substanzen werden ausgewaschen, wobei jedoch die Struktur und die Funktion des Herzens weitgehend intakt bleiben. Daher können gezielte Substitutionsversuche durchgeführt werden, die eine Koordination biophysikalischer und biochemischer Untersuchungen erlauben.

Durch die Verarmung an endogenen Substraten und enzymatischen Cofaktoren gerät das Froschherz in eine Hypodynamie, die sich bei kymographischer Registrierung in einer Abnahme der Kontraktionsamplitude zeigt.

Über den Zustand des Herzens im Stadium der Hypodynamie wurden von Asbeck (41) biochemische und morphologische Untersuchungen durchgeführt:

Die Froschherzen zeigen nach 16-stündiger Perfusion einen Anstieg des Stickstoffgehaltes um ca. 7 %, bezogen auf Trockengewicht. Dies deutet auf den Verlust nicht eiweißartiger Substrate wie Kohlenhydrate, Fette usw. hin. Allgemein werden Stoffe mit hohem Umsatz, sowie leicht ausspülbare niedermolekulare Stoffe bevorzugt entfernt, was zu einem relativen Anstieg der N-haltigen Eiweißkörper und Nucleinsäuren führt.

Indirekt ist die Verarmung des hypodynamen Systems an Substraten und enzymatischen Cofaktoren auch durch die Messung der Atmung von Herzhomogenaten nachweisbar.

Die Substrate Fruktose, Glukose, Betahydroxybutyrat, Pyruvat+Malat steigern die Atmung der Homogenate hypodynamer Herzen deutlich (20 - 100 %), während nur Pyruvat+Malat am frischen Herzen wirksam sind.

Die Cofaktoren der Atmungskette Cytochrom c, DPN^+ und Mg^{++} steigern die Atmung der Herzhomogenate hypodynamer Systeme stärker

als die der frischen Herzen. Hierbei wird ein nach der Perfusion offensichtlich bestehender Mangel an diesen Stoffen behoben.

Wirkungen von K-Vitaminen am hypodynamen Herzen

Das hypodynamie Herz wäre für die Untersuchung der Wirkungsspezifität von Chinonen geeignet, wenn es gelänge zu zeigen, daß auch biogene Chinone in ihrer Konzentration während der Perfusion abnehmen. Erste Anhaltspunkte hierfür gab die Untersuchung der Wirkung von K-Vitaminen am hypodynamen Herzen.

1. Atmungsmessungen mit Homogenaten des hypodynamen Systems.

Die Atmung von Zellhomogenaten des hypodynamen Systems konnte durch Zugabe von Vitamin K₁ in Konzentrationen von 8×10^{-4} bzw. $7,8 \times 10^{-3}$ molar um ca. 30 % gesenkt werden. An Homogenaten frischer Herzen war keine Wirkung zu erzielen. Dieser Befund stimmt überein mit Ergebnissen von Martius (15, 42) an isolierten Mitochondrien. Menadion (Vitamin K₃) führte zu einer Hemmung der Atmung der Homogenate aus frischen Herzen, was als toxischer Effekt gedeutet werden muß.

2. Energiestoffwechsel.

Durch Analysen der energiereichen Phosphate wurde versucht, einen direkten Einblick in den Energiestoffwechsel des hypodynamen Systems zu erhalten. Als besonders aussagekräftig erwiesen sich ATP- und Kreatinphosphat-Analysen in den Herzen nach Ausschaltung der kontraktionsabhängigen ATPase durch Acetylcholin, da hierbei vermehrt gebildetes energiereiches Phosphat nicht sofort durch vermehrte Kontraktionsleistung abgebaut wird.

In den hypodynamen Herzen zeigte sich eine Abnahme des Kreatinphosphatgehaltes um 15 %, des ATP-Gehaltes um 13 %. Dies entspricht einer Abnahme von 8,5 μMol energiereichen Phosphates pro Gramm Trockensubstanz. Bei Reaktivierung mit Vitamin K₁ stieg die Kreatinphosphatkonzentration um 12 %, die ATP-Konzentration um 8 % an, insgesamt wurde ein Anstieg des energiereichen Phosphates um ca. 5 $\mu\text{Mol/g}$ Trockensubstanz erreicht.

3. Physiologische Funktion.

Die Energie für die Kontraktion des Herzmuskels wird in Form von ATP bereitgestellt. Durch die Messung der Kontraktionsleistung des Herzens können daher alle Faktoren, die den Spiegel

der energiereichen Phosphate beeinflussen integriert werden. Eine Verstärkung der Kontraktionsleistung des hypodynamen Herzens weist also auf eine Erhöhung des Spiegels der energiereichen Phosphate hin.

Im Verlauf der 15-stündigen Perfusion fällt die Kontraktionsamplitude der Herzen auf ca. 24 % des Ausgangswertes. Durch Zusatz von Vitamin K₁ ($1,33 \times 10^{-4}$ molar) zusammen mit Fruktose wird die Hubhöhe um 30 % auf ca. 54 % der Ausgangshubhöhe gesteigert. Der Effekt ist nach 10 Minuten bereits voll sichtbar. Fruktose allein führt nur zu einer durchschnittlichen Steigerung um 9 %. Menadion war in niedrigen Konzentrationen ($1,33 \times 10^{-5}$ molar) ohne Wirkung. Höhere Konzentrationen wirkten deutlich hemmend.

Von Bedeutung sind auch die Wirkungen von Entkopplern der oxydativen Phosphorylierung (Dicumarol und Dinitrophenol). Sie wirken in Konzentrationen von $1,14 \times 10^{-6}$ molar (Dicumarol) bzw. $5,0 \times 10^{-6}$ molar (Dinitrophenol) hemmend auf die Kontraktionsamplitude des hypodynamen Herzens. Bei hypodynamen Herzen, die mit Fruktose und Vitamin K₁ reaktiviert waren, war zur Hemmung der Herzleistung, verglichen mit den Kontrollen ohne Vitamin K₁ die 4-fache Konzentration an Dicumarol und die 2,5-fache Konzentration an Dinitrophenol notwendig. Es scheint sich demnach bei der Wirkung der Entkoppler um eine kompetitive Hemmung zu handeln, die durch hohe Konzentrationen an Vitamin K₁ teilweise aufgehoben werden kann. Im Gegensatz zu den Wirkungen, die das Vitamin K₁ am hypodynamen Herzen entfaltet, zeigt sich am intakten Organ kein Effekt. Dies spricht für eine Verminderung der Konzentration des Vitamins K in hypodynamen Herzen.

4. Testung von α -Tocopherol.

Die kymographischen Untersuchungen über die Wirkung von Vitamin K₁ auf die Kontraktionskraft des hypodynamen Herzens wurden auch auf α -Tocopherol ausgedehnt (40). Bei hypodynamen Froschherzen mit einer Hubhöhe von 18,4 % des Ausgangswertes wurde die Amplitude auf max. 42 % gesteigert. Der Leistungszuwachs betrug demnach 23,5 %. Die Wirkung trat im Allgemeinen langsamer ein, als bei Vitamin K.

5. Wirkung von ATP auf das hypodynamie Herz.

Wie bereits oben ausgeführt wurde, beruht die aktivierende Wirkung der Chinone auf das hypodynamie Herz auf der Steigerung der ATP-Synthese. Eine Reaktivierung müßte also auch durch ATP zu erzielen sein.

Dohrn (40) konnte am hypodynamen Herzen (durchschnittliche Ermüdungshöhe 28,8 %) zwei Wirkungen des ATP nachweisen. Nach Zugabe von ATP ($2,7 \times 10^{-5}$ molar) in Gegenwart von Fructose kontrahiert sich der Muskel mehrmals sehr stark, sinkt dann auf eine oft unter dem Ermüdungswert liegende Amplitude ab und steigt schließlich innerhalb von 20 Minuten wieder auf einen Wert von ca. 60 % der Ausgangshöhe an. Der Verlauf der Reaktivierung ist vermutlich durch zweifache Wirkung von ATP bedingt, einer pharmakologisch-toxischen und einer Wirkung auf den Energiehaushalt.

6. Morphologischer Zustand.

Die reaktivierende Wirkung von Vitamin K_1 auf das hypodynamie Froschherz ist auch am morphologischen Bild zu verfolgen.

Am hypodynamen Herzen zeigte sich gegenüber dem frischen Organ makroskopisch eine Dilatation der Kammer und der Vorhöfe. Das mikroskopische Präparat zeigt eine deutliche Verbreiterung der extrazellulären und interstitiellen Räume. Reaktivierung des Herzens durch Vitamin K_1 +Fructose führt zu einer weitgehenden Normalisierung dieses Bildes, sowohl in Form einer Verkleinerung der Kammern, als auch in einem Rückgang der interstitiellen Räume.

Wie im Vorangehenden dargestellt wurde, zeigt sich die reaktivierende Wirkung des Vitamin K_1 am hypodynamen Herzen in einer Verminderung der Zellatmung, in der Steigerung der Synthese der energiereichen Phosphate, der Erhöhung der Kontraktionskraft und in der Wiederherstellung des morphologischen Zustandes der kontraktilen Elemente. Die Wirkung ist kompetitiv hemmbar durch die bekannten Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung Dicumaryl und Dinitrophenol. Sie läßt sich nicht mit Vitamin K_3 erzielen.

Die Ursache des Effektes scheint eine Verarmung des hypodynamen Herzens an Vitamin K oder eine Änderung der intrazellulären

Verteilung zu sein, was zu einer Entkopplung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung führt.

Die hier geschilderten Ergebnisse zeigen, daß Vitamin K₁ oder ein in der Zelle daraus hervorgehender Cofaktor spezifisch in Vorgänge des Energiestoffwechsels eingreift.

METHODIK

=====

1. Biologisches Material

a) Kalbsherz

Zur Ausarbeitung der Bestimmungsmethode für Ubichinon wurde Kalbsherzgewebe verwendet, welches direkt nach dem Schlachten des Tieres (spätestens nach 10 Min.) entnommen und auf Eis gekühlt wurde. Nach Abpräparation von Fett und Fascien wurde das Gewebe in kleine Stücke zerschnitten und eingefroren, wie auf S.58 angegeben.

b) Froschherz

Für die Perfusionsversuche wurden Froschherzen einheimischer *Rana temporaria* verwendet. Die Frösche wurden in der Regel im November gefangen und bis zur Verwendung (von November bis Ende Februar) in Käfigen bei ca. 10° Wassertemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

2. Perfusionsversuche

a) Präparation der Froschherzen

Die Frösche wurden dekapitiert, das Rückenmark zerstört und das Herz freigelegt. Nach Eröffnung und Abpräparation des Herzbeutels wurde die Spitze einer Straub-Kanüle durch die linke Aorta in den Ventrikel eingeschoben und über den Vorhöfen befestigt. Anschließend wurde das Herz von seinen dorsalen Verbindungen gelöst und die Vorhöfe gegen den Venensinus abgebunden, um ein Undichtwerden des Herzens während der Dauer des Versuchs zu vermeiden.

Zur Perfusion wurde eine modifizierte Straub-Kanüle verwendet (40). Dicht über dem zum Ventrikel führenden Zulaufstutzen ist ein Überlaufröhrchen angebracht, durch welches die dem Herzen zugeführte und durch die Systole des Ventrikels wieder ausgetriebene Tyrodelösung wieder abgeleitet wird. Dadurch wird jede mechanische Beeinflussung der Kontraktionsstärke durch wechselnden Kanüleninhalt vermieden. Das auf der Kanüle fixierte Herz wird in eine feuchte Kammer gebracht und die Herzkontraktion auf einem mit einer Klemme an der Herzspitze befestigten Schreibhebel übertragen und an einem Trommelkymographen registriert.

b) Perfusionslösung

Die Durchströmung erfolgte mit isotonischer, brennstofffreier und sauerstoffgesättigter Tyrodelösung folgender Zusammensetzung (40):

NaCl	0,65 %	CaCl ₂	0,02 %
KCl	0,02 %	NaHCO ₃	0,07 %
MgCl ₂	0,01 %	NaH ₂ PO ₄	0,005 %

alle Substanzen pro analysi

Die Angaben beziehen sich auf kristallwasserfreie Trockensubstanz. Die Lösung wurde auf ein pH von 7,45 eingestellt. Die Gefrierpunktserniedrigung betrug 0,43⁰, der osmotische Druck $p_t = 5,65$.

Zur Registrierung der isotonischen Kontraktion wurde das Herz in eine feuchte Kammer gebracht und durch eine Klemme mit dem Schreibhebel eines Kymographen verbunden.



Abb. 2: Feuchte Kammer zur Perfusion von Froschherzen.

Zur Herstellung größerer Mengen von hypodynamen Herzen zur chemischen Analyse, insbesondere zur Ubichinonbestimmung, diente eine Perfusionskammer, in der gleichzeitig 25 Froschherzen perfundiert werden können (Abb. 2). Die Herzen wurden mit den Kanülen an einer Halterung befestigt und über eine Klemme mit einem frei hängenden Bleigewicht von 0,5 g belastet. Die Tyrodelösung wurde über eine Verteilerröhre zugetropft. Die Sauerstoffversorgung erfolgte einerseits durch O_2 -Sättigung der Vorratslösung, andererseits durch direkte Sauerstoffzufuhr in die feuchte Kammer.

3. Stickstoffanalyse

Mikroanalyse nach Kjeldahl (43) wurde mit 5 mg des lyophilisierten Trockenpulvers durchgeführt. Die Veraschung erfolgte 1 Stunde mit 4 ml konz. H_2SO_4 p.A. und einer Spatelspitze Selenreaktionsgemisch (nach Wieninger). Zur Destillation wurde (bezogen auf die eingesetzte H_2SO_4) die 5-fache Menge an NaOH (32 %) verwendet. Die Vorlage enthielt 10 ml 0,5 % H_3BO_3 und 3 Tr. Tashiro-Mischindikator. Das in der Vorlage absorbierte NH_4OH wurde mit n/100 HCl titriert.

4. Verwendung von Ubichinon₅₀ und ₃₀ zur Perfusion

Da die Ubichinone aufgrund ihrer Lipidstruktur in Wasser unlöslich sind, mußte eine Methode zur möglichst feinen Emulgierung bzw. Suspendierung gefunden werden. (Ubichinon₅₀ stand als kristallisiertes Produkt zur Verfügung, während Ubichinon₃₀ als Öl vorlag). 1.) 5,6 mg Ubichinon₅₀ wurden in 1 ml Aceton p.A. gelöst und in 50 ml Tyrodelösung (+ 0,2 % Fruktose) pipettiert. Zur Entfernung des Acetons wurde die Suspension 5 Min. bei 37° C im Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend mit Aqua bidest wieder auf 50 ml aufgefüllt. 2.) 3,8 mg Ubichinon₃₀ wurden in 50 ml Tyrodelösung (+ 0,2 % Fruktose) durch Ultraschall emulgiert. 3.) Fruktosehaltige Tyrodelösung für die Kontrollversuche wurde hergestellt wie unter 1.) angegeben, unter Verwendung von 1 ml Aceton p.A. ohne Ubichinon. Das Ubichinon war in den Lösungen $1,3 \times 10^{-4}$ molar.

5. Verseifung des Gewebstrockenpulvers (44)

Zur Freisetzung des nach Ultraschall-Extraktion in Gewebe zurückgebliebenen Ubichinons wurde die Gewebsverseifung nach Crane (44) verwendet.

Der Verseifungsansatz enthielt:

Extrahiertes Trockenpulver, im Glaspotter homogenisiert
mit 4-facher Menge (v/g) H_2O (= 100 Vol %)
dazu 15 % g/v KOH (in Substanz)
10 % g/v Pyrogallol (in Substanz)
150 % v/v Athanol 96 %

Arbeitsweise:

Der Ansatz wurde 20 Min. im Rückfluss erhitzt, sofort anschließend gekühlt, durch H_2O -Zugabe auf 50 % Äthanolgehalt gebracht und 8mal mit gleichem Volumen n-Heptan extrahiert. Die vereinigten n-Heptan-Extrakte wurden über Na_2SO_4 anhydric. getrocknet und eingeengt.

6. Reinigung des Kieselgels für Dünnschichtchromatographie

1 kg Kieselgel HF₂₅₄ (Merck) wurde 3mal mit je 5 l Petroläther-Methanol 90:10 1 Stunde gerührt und jeweils auf einer Filternutsche das Lösungsmittel abgesaugt. Anschließend wurde mit ca. 2 l Aqua dest. nachgewaschen und das Kieselgel im Trockenschrank bei 90° C getrocknet.

7. Chinonverbindungen

Die für die chromatographischen Versuche verwendeten Chinone wurden uns freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt.

Einfluss der Perfusion auf die Chinonkonzentration des perfundierten Herzens

Die Arbeiten von Dohrn (40) und Asbeck (41) hatten Hinweise dafür gebracht, daß die Vitamine E und K spezifisch in Vorgänge des Elektronentransportes und der oxydativen Phosphorylierung eingreifen. Sie beruhen im Prinzip auf der Erfüllung des zweiten Kriteriums von Slater (s.S. 11), was die Entfernung der Chinone aus dem Gewebe oder zumindest Konzentrationsverminderungen am Wirkort in den Mitochondrien voraussetzt.

Es war daher das Ziel der vorliegenden Arbeit, zur Vertiefung der bisherigen Ergebnisse Einblick in die qualitative und quantitative Ausstattung des Froschherzens mit Chinonen zu geben. Insbesondere sollte festgestellt werden, in welchem Umfang sich die Konzentration der präformierten Chinone oder ihre intrazelluläre Verteilung ändert, wenn das perfundierte Herz in den Zustand der Hypodynamie gerät.

Die quantitative Bestimmung von Chinonen in kleinen Gewebsproben ist mit erheblichen methodischen Schwierigkeiten verbunden. Um dies zu verdeutlichen, soll zunächst ein Überblick über die wichtigsten Methoden der Chinonanalytik gegeben werden.

Extraktionsmethoden =====

Die quantitative Bestimmung der Chinone erfolgt in Extrakten, die aus den Gewebsproben durch Behandlung mit organischen Lösungsmitteln gewonnen werden. Die verschiedenen, bisher verwendeten Extraktionsmethoden unterscheiden sich durch die Art der Vorbehandlung und des Aufschlusses der Gewebsproben und durch die Verwendung von Lösungsmittelgemischen verschiedener Polarität.

Crane (44) unterschied bei der Gewinnung von Ubichinon aus wässrigen Homogenaten tierischer Gewebe zwischen der direkten Extraktion mit organischem Lösungsmittel (Äthanol/Äther 3:1 (V:V)) und dem Aufschluß des Materials durch Verseifung in äthanolischer KOH unter Pyrogallolschutz. Zur Isolierung des Ubichinons aus dem Verseifungsansatz wird dieser mehrmals mit n-Heptan ausgeschüttelt.

Eine Methode von Green (45) dient zur gleichzeitigen Bestimmung von Tocopherolen, Ubichinonen, Ubichromenolen und K-Vitaminen. Das biologische Material wird mehrere Stunden bei minus 70°C im Dunkeln in einem Gemisch aus Natriumsulfat anhydricum, Aceton und frisch gebrochenem Trockeneis homogenisiert und anschließend mehrmals mit Aceton extrahiert. Eine Verseifung des Extraktes unter Pyrogallolschutz wird angeschlossen.

Für die Extraktion des Ubichinons⁵⁰ aus Mitochondriensuspensionen empfehlen Klingenberg und Kröger (35) ein Gemisch von Petrol-äther-Methanol 1:1.

Bei der Anwendung der genannten Extraktionsmethoden ergeben sich zwei wesentliche Schwierigkeiten. Direkte Extraktion mit Lösungsmitteln (Crane (44) und Green (45)) führt im Bereich des Ubichinons zur Freisetzung von 75 % des gesamten Ubichinons (46). Der Rest ist fest gebunden und erst durch alkalische Verseifung unter Pyrogallolschutz aus dem Gewebe zu entfernen.

Die Verseifung des Gewebes hingegen führt bei einer Reihe von Chinonen zu chemischen Veränderungen: z.B. wird Ubichinon teilweise in Ubichromenol umgewandelt (47).

Trennmethoden =====

Zur Abtrennung der Ubichinone von Begleitstoffen der Gewebs-extrakte dienen in allen Fällen chromatographische Methoden. Eine Betrachtung der wichtigsten Bestimmungsverfahren zeigt, daß im Allgemeinen zur Vorfraktionierung und Abtrennung quantitativ überwiegender Verunreinigungen Säulenchromatographie verwendet wird, während die Differenzierung der Chinone und nahe verwandter Verbindungen durch Papierchromatographie oder Dünnschicht-chromatographie erfolgt. Auf einige Ausnahmen wird im Folgenden ebenfalls eingegangen.

1. Säulenchromatographie

Alle säulenchromatographischen Verfahren zur Reinigung von Chinonen aus Gewebsextrakten bedienen sich polarer Adsorbentien. Die Chinone werden in unpolaren Lösungsmitteln aufgetragen. Hierbei sind sie fest an die Säule adsorbiert. Verunreinigungen können mit unpolarem Lösungsmittel ausgewaschen werden, die

Elution der Chinone erfolgt mit polaren Lösungsmitteln.

Crane (44) empfiehlt zur Reinigung verseiften Extrakte Säulenchromatographie auf Decalso, bei direkter Äthanol-Ather-Extraktion hingegen Kieselsäure als Adsorbens. An beiden Adsorbentien bleibt Ubichinon adsorbiert, wenn die Säule mit Petroläther oder Isooctan beschickt wird. Die Elution des Ubichinons erfolgt mit Lösungsmittelgemischen, die Zusätze von Aceton oder Diäthyläther enthalten.

Green (45) verwendet zur säulenchromatographischen Vorreinigung verseiften Extrakte Decalso F als Adsorbens. Die Proben werden in Petroläther aufgetragen. Ubichinone, Ubichromenole, α -Tocopherol und Vitamin K sind hierbei adsorbiert, Verunreinigungen werden mit einer größeren Menge Petroläther ausgewaschen. Zur Elution der Chinone wird Benzol verwendet. Das Benzoleluat kann ohne weitere Vorbehandlung papierchromatographisch aufgetrennt werden.

Weitere Adsorbentien zur Säulenchromatographie von Chinonen sind Aluminiumoxyd (49, 50, 51, 52) und Florisil (53). Es bestehen keine prinzipiellen Unterschiede in der Verwendbarkeit der einzelnen Adsorbentien.

Für quantitative Chinonanaysen sind die Reinigungseffekte der Säulenchromatographie meist nicht ausreichend. Insbesondere ist es im Allgemeinen nötig, die Chinone untereinander aufzutrennen, da die gängigen Messmethoden meist mehrere Chinonsysteme erfassen (siehe Messmethoden für Chinone S. 32). Zur weiteren Differenzierung der Chinonderivate werden daher Papierchromatographie oder Dünnschichtchromatographie verwendet.

2. Papierchromatographie

Die wichtigsten papierchromatographischen Methoden zur Auftrennung von Chinonen aus tierischem Gewebe wurden von Green (45, 48), Lester und Ramasarma (54) und von Linn (55) angegeben. Die genannten Methoden erfordern alle die Vorreinigung der Gewebsextrakte durch Säulenchromatographie.

Green verwendet zur zweidimensionalen Chromatographie Zinkcarbonat imprägniertes Papier. Das Chinongemisch wird auf einer Ecke des quadratischen Papiers aufgetragen. In der ersten Dimension

dient das Gemisch 30 % v/v Benzol in Cyclohexan als mobile Phase. Zur Trennung in der zweiten Dimension wird das Papier mit Paraffinöl imprägniert (Phasenumkehr). Als mobile Phase dient 75 %iges Athanol.

Das System erlaubt die Auftrennung von Ubichinon_{50,45,40,35}, Ubichromenol₃₅₋₅₀ und von Tocopherolen, Tocopherylinon und Vitamin K₁.

Imprägnierung des Papiers zur Erzielung einer Phasenumkehr liegt auch den Methoden von Lester und Ramasarma (54) und von Linn (55) zugrunde. Nach Lester und Ramasarma wird das Papier mit 2 % Silicondiol, gelöst in Chloroform, imprägniert, Linn verwendete 5 % Vaselinöl in Petroläther. Zur Auftrennung werden polare Lösungsmittel verwendet, z.B. Propanol-H₂O 4:1 (Lester, Ramasarma) bzw. 3 % H₂O in Dimethylformamid gesättigt in Vaselinöl (Linn).

Die Papierchromatographie mit umgekehrter Phase eignet sich insbesondere zur Auftrennung von Ubichinonhomologen mit verschieden langer Isopren-Seitenkette.

Die Ergebnisse der papierchromatographischen Auftrennung von Chinonsystemen sind in starkem Maße abhängig vom Grad der Verunreinigung durch Beistoffe und von der Menge der aufgetragenen Chinone (45).

3. Dünnschichtchromatographie

Unempfindlicher gegen die oben genannten Störungen und daher besser reproduzierbar sind die Ergebnisse mit Dünnschichtchromatographie. Die im Folgenden beschriebenen Trennverfahren wurden alle auf Kieselgel G ausgeführt.

Wagner (57) versuchte Ubichinonanalysen von Lipidgesamtextrakten aus Rinderherz ohne vorhergehende Säulenchromatographie durchzuführen. Als Vorbehandlung wurden lediglich die Phosphatide mit Aceton ausgefällt. Zur Auftrennung der Ubichinone von den übrigen Lipiden diente das System Benzol-Chloroform 1:1. Die Ubichinonhomologen der Reihe Ubichinon₇₀ bis Ubichinon₅₀ wurden auf Paraffinöl-imprägnierter Platte im System Aceton-paraffinöl-gesättigtes H₂O von einander abgetrennt.

Weitere dünn-schichtchromatographischen Systeme wurden von Bollinger (58) angegeben: Zur Auftrennung verschiedener Tocopherole

diente das System Benzol-Methanol 98+2, bzw. Cyclohexan-Äther 80+20.

Martius (42) verwendete zur Bestimmung von radioaktiv markiertem Vitamin K (Vitamin K₁ und K₂₍₂₀₎) in verschiedenen Organen von Kücken ebenfalls dünnschichtchromatographische Methoden. Die Extrakte aus den Geweben wurden mit Craig-Verteilung vorge-reinigt.

Bei Dünnschichtchromatographie im Gemisch n-Heptan-Benzol 1:1 wurden weitere Verunreinigungen abgetrennt. Die K-Vitamine blieben hierbei am Start liegen. Nach Trocknen der Platte wird mit reinem Benzol weiterchromatographiert. Hierbei wird eine gute Trennung der verschiedenen K-Vitamine erreicht.

Chinonnachweis auf Chromatogrammen

=====

Da es sich bei der Chromatographie von Chinonen aus Gewebeproben meist nur um sehr kleine Mengen (im Bereich von 10 - 100 μ) handelt, die oft nicht auf Grund ihrer Eigenfärbung sichtbar sind, mußten Methoden entwickelt werden, die eine Identifizierung der Fraktionen auf den fertigen Chromatogrammen erlauben. Prinzipiell können für Papier- und Dünnschichtchromatographie dieselben Methoden verwendet werden. Auf Papierchromatogrammen sind die Möglichkeiten jedoch eingeschränkt, da aggressive Substanzen oder Hitze einwirkung hier nicht angewendet werden können. Die vorhandenen Identifizierungsmethoden werden daher unter Berücksichtigung der Dünnschichtchromatographie beschrieben.

Die einfachste Methode der Auffindung von Chinonfraktionen auf Dünnschichtchromatogrammen ist die Betrachtung unter UV-Licht. Bei Zusatz eines Fluoreszenzstoffes zu dem Kieselgel der Platte (z.B. in Kieselgel HF₂₅₄) erscheinen die Ubichinone, K-Vitamine und Tocopherole als dunkle Flecken auf hellem Untergrund.

Die empfindlichste Nachweismethode für Spuren organischer Substanzen ist die Besprühung des Chromatogrammes mit konzentrierter H₂SO₄ und anschließendes Erhitzen auf 110° C für 10 Minuten. (59).

Zur Differenzierung verschiedener Chinone dienen Sprühreagenzien. Einen Überblick über die wichtigsten, auf Dünnschichtchromato-

grammen durchzuführenden Färbereaktionen gibt Stahl (59). In folgender Tabelle sind die Ergebnisse zusammengestellt, die wir bei Verwendung der angegebenen Reagentien durch eigene Versuche auf Kieselgelplatten ermitteln konnten.

Tab. 3: Farbreaktionen von Ubichinon₃₀ und ₅₀ und von Vitamin K₁ und K₂ mit Sprühreagentien.

Reagentien: 1 = FeCl₃ in H₂O (1 % g/v)

2 = Phosphormolybdänsäure in Äthanol (5 % g/v)

3 = Cer-IV-Sulfat (Stahl-Reagenz Nr. 25)

4 = Rhodamin B (Stahl-Reagenz Nr. 129)

5 = Eisendipyridyl-Reagenz (beschr. Stahl S.239)

6 = Antimontrichlorid (Stahl-Reagenz Nr. 11)

Reagenz Nr.	1	2	3	4	5	6
Ubichinon ₃₀	keine Färbung	grün auf gelbem Grund	braun violett auf gelbem Grund	violett auf rotem Grund	rötlich-beige (blass)	braun-violett (intensiv)
Ubichinon ₅₀	"	"	"	"	"	"
Vitamin K ₁	"	"	"	"	rötlich (blass)	olivgrün später graugrün (intensiv)
Vitamin K ₂	"	"	"	"	rötlich beige (blass)	braun (kräftig)

Die Tabelle zeigt, daß die Reagentien 1 mit 4 nur zum allgemeinen Nachweis von Fraktionen dienen können. Spezifische Anfärbung der Chinone und Unterscheidung der Stoffe voneinander ist mit den Reagentien 5 und 6 möglich. Ubichinon₅₀ und ₃₀ färben sich mit Reagenz 5 in einem blassen, rötlichen Farbton und mit Reagenz 6 intensiv braun-violett. Sie sind daher von den K-Vitaminen, nicht aber voneinander zu unterscheiden. Daß sich Vitamin K₂ mit

Reagenz 5 wie Ubichinon färbt, dient seiner Unterscheidung von Vitamin K₁. Von Ubichinon wird es mit Reagenz 6 unterschieden. Mit diesem Reagenz werden außerdem die beiden K-Vitamine verschieden gefärbt.

Messmethoden für Chinone

=====

Die beschriebenen Nachweismethoden dienen der Auffindung der Chinone auf den Chromatogrammen. Zur quantitativen Bestimmung müssen die Substanzen aus den Flecken eluiert werden.

Die gebräuchlichen Messmethoden für Chinonverbindungen beruhen auf der Absorption der Stoffe im UV, auf Absorptionsänderungen im UV bei Reduktion oder auf der Absorption im sichtbaren Wellenlängenbereich nach Einbeziehung der Chinone in spezifische Farbreaktionen. Außerdem kann in einigen Fällen die biologische Wirksamkeit zur quantitativen Messung herangezogen werden.

1. Messmethoden für Vitamin K

a) UV-Absorption

Nach Ewing und Mitarbeiter (60) kann Vitamin K₁ auf Grund seiner UV-Absorption gemessen werden. Der Extinktionscoefficient bei 249 mμ beträgt: $\log \epsilon = 4,27$.

b) Polarographische Messung (61)

Eine polarographische Bestimmung von Vitamin K₁ kann in Iso-propanol+KCl in wässriger Lösung 1:1 durchgeführt werden. Die Methode benötigt jedoch große Mengen von Vitamin K₁ (0,5 mg).

c) Redoxreaktion mit 2,6-Dichlorindophenol

Die colorimetrische Methode nach Scudi und Buhs (62) beruht auf der katalytischen Hydrierung des chinoiden Systems zum Hydrochinon. Dieses wird mit 2,6-Dichlorindophenol im Überschuß unter Ausschluß von Luftsauerstoff behandelt. Die Verminderung der Farbtintensität des Indophenols bei 670 mμ wird zur Berechnung der Konzentration des Vitamin K verwendet. Die Methode erlaubt die Erfassung von Vitamin K₁-Mengen bis 5 g/ml.

d) Dam-Karrer-Test

Die Instabilität verschiedener Chinone gegenüber Alkali führt zu gefärbten Verbindungen auf der Basis mesomerer Ionen (63). Vitamin K ergibt in äthanolischer Lösung bei Behandlung mit äthanolischer KOH eine rote Färbung mit einem Absorptionsmaximum bei 580 m μ .

e) Irreverre-Sullivan-Test

Eine Verbesserung des Dam-Karrer-Tests stellt der Irreverre-Sullivan-Test dar. Zusätzlich zu dem äthanolischen Alkali wird hier noch Natriumdiäthylthiocarbamat verwendet, wodurch sich die Absorption bei 575 m μ durch Bildung eines Farbkomplexes verdoppelt (44).

f) Biologischer Test

Die spezifische Auswirkung eines Vitamin K-Mangels auf die Blutgerinnung von Kücken erlaubt eine Bestimmung des Vitamins im biologischen Test.

Biologische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Vitamin K und seinen Derivaten existieren seit 1938 (64). Hier soll das Prinzip der Methode anhand einer 1950 veröffentlichten, verbesserten Arbeitsweise beschrieben werden, das auf der Messung der Blutgerinnungszeit von Vitamin K-Mangelkücken vor und nach der Applikation des Teststoffes beruht (65):

Neugeborene Kücken werden in zwei Gruppen aufgezogen. Die eine Gruppe wird mit einer Standardnahrung gefüttert, die andere erhält ein Vitamin K-freies Futter. Nach 4 - 6 Wochen zeigen die Vitamin K-Mangelkücken hämorrhagische Erscheinungen und sind nun für den Test brauchbar. Die Blutgerinnungszeit wird mit Blutproben bestimmt, die bei der Entnahme aus der arteria carotis durch Citratzusatz (Bindung des zur Gerinnung notwendigen Calciums) ungerinnbar gemacht werden. In einem Thermostaten werden den Proben Thromboplastin und Calciumchlorid zugesetzt und die Zeit bis zur Gerinnung gemessen. Wenn die Gerinnungszeit des Versuchstieres bekannt ist, wird der zu prüfende Stoff appliziert und nach 20-22 Stunden erneut die Gerinnungszeit bestimmt. Die Wirkung einer Testsubstanz wird mit der gerinnungsfördernden Wirkung von Menadion verglichen und in % der normalen

Gerinnungszeit, welche bei den Kontrolltieren gemessen wird, ausgedrückt.

2. Messmethoden für Ubichinon

a) Reduktion mit Kaliumborhydrid

Die heute am meisten angewandte Methode zur quantitativen Bestimmung von Ubichinon wurde von Crane (44) angegeben. Sie beruht auf der charakteristischen Absorptionsabnahme der Verbindung im UV-Bereich, die eintritt, wenn das chinoide System reduziert wird. Das Maximum der Absorptionsabnahme liegt bei 275 m μ . Die Reduktion erfolgt in Äthanol durch Zugabe von Kaliumborhydrid.

Reduziertes Ubichinon wird mit Silberoxyd (Ag₂O) oxydiert und kann so mit derselben Methode erfaßt werden.

Zur Berechnung der Ubichinonkonzentration dient der Extinktionskoeffizient.

$$\Delta E \begin{matrix} 1 \% \\ 1 \text{ cm (ox - red) (275 m}\mu\text{)} \end{matrix} = 142$$

Die Methode ist nicht für Ubichinone spezifisch. Auch Vitamin K führt zu einer Extinktionsänderung (s.S.41).

Neben dieser einfachen Reduktionsmethode sind verschiedene colorimetrische Verfahren in Gebrauch, die zwar bezüglich Spezifität keinen Vorteil bieten, aber teilweise größere Empfindlichkeit zeigen.

b) Craven-Test (66)

Bei Einwirkung von Äthylcyanoacetat in alkalischer Äthanol-lösung erfolgt der Austausch einer Methoxygruppe des Ubichinons gegen ein Äthylcyanoacetat-Anion. Es entsteht hierbei ein blauer Farbstoff mit maximaler Absorption bei 620 m μ . Die quantitative Auswertung erfolgt anhand einer Eichkurve, für deren Aufstellung reines Ubichinon verwendet wird. Der Craven-Test ist der spezifischste unter den colorimetrischen Tests für Ubichinon. Nur die selten vorkommenden Tocopherolderivate β - und γ -Tocopherylchinon reagieren ebenfalls. Vitamin K₁ ergibt keine Reaktion.

c) Dam-Karrer-Test

Das Prinzip dieses Tests wurde bei der Besprechung der Vitamin K-Nachweismethoden dargestellt. Die quantitative Messung des mit Ubichinon erhaltenen Farbstoffkomplexes erfolgt ebenfalls bei 580 m μ . Zur Bestimmung werden 30-150 μ g Ubichinon₅₀ benötigt.

d) Irreverre-Sullivan-Test

Auch dieser Test wurde bereits bei den Bestimmungsmethoden von Vitamin K beschrieben.

3. Messung von α -Tocopherol

Für die quantitative Bestimmung von α -Tocopherol wurde 1938 von Emmerie und Engel (67) eine Methode angegeben, die auf der reduzierenden Wirkung der Substanz beruht. Eisen-III-chlorid wird durch α -Tocopherol zu Eisen-II reduziert. Dieses bildet mit $\alpha\alpha'$ -Dipyridyl einen gefärbten Komplex mit maximaler Absorption bei 520 m μ . Für die quantitative Auswertung wird eine Eichkurve durch Messung bekannter Mengen von α -Tocopherol angelegt.

Darstellung der wichtigsten Chinonbestimmungs-
verfahren

Das Ziel der vorangehenden Kapitel war es, einen Überblick über die wichtigsten Methoden zu geben, die zur Extraktion, zur Auftrennung, zur Identifizierung und zur quantitativen Bestimmung von Chinonen zur Verfügung stehen. Es soll nun an einigen Beispielen gezeigt werden, wie diese Methoden zum Aufbau von Chinonbestimmungsverfahren in tierischem Gewebe verwendet wurden.

Methode von Green

Eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Ubichinon, Ubichromenol, Tocopherol, Tocopherylchinon und Vitamin K₁ beschreibt Green (45). Das Material wird im Dunkeln bei - 70° C in einem Gemisch aus Natriumsulfat anhydric., Aceton und frisch gebrochenem Trockeneis mehrere Stunden homogenisiert und mit Aceton mehrmals extrahiert. Nach einer Verseifung unter Pyrogallolschutz und anschließender Methanolfällung der Steroide aus dem Extrakt bei

- 15° C wird die methanollösliche Fraktion in Leichtpetroleum vom Siedepunkt 40 - 60° C aufgenommen und auf eine Decalso F-Säule gebracht. Die Säule wird mit Petroläther gewaschen, anschließend werden die Chinone mit Benzol als geschlossene Fraktion eluiert. Die Chinonfraktion wird nun einer zweidimensionalen Papierchromatographie unterworfen (s.S.28). Es werden zwei Chromatogramme angefertigt, von denen eines mit FeCl_3 - Dipyridyl-Reagenz besprüht wird um die Fraktionen zu identifizieren. Aus dem zweiten werden die Flecken ausgeschnitten und eluiert. Die Bestimmung von Tocopherol erfolgt im Eluat mit α' -Dipyridyl-Reagenz, Ubichromenol wird nach Emmerie u. Engel (67) (s.S.35), Ubichinon nach Crane (44) mit KBH_4 nachgewiesen. Tocopherylchinon und Vitamin K_1 werden auf Grund ihrer Spektren nachgewiesen.

Methode von Crane (44)

Die Methode von Crane dient zur Bestimmung von Ubichinon in tierischem Gewebe. Das Analysenmaterial wird in Stücke geschnitten und unter Zusatz von Äthanol homogenisiert. Es erfolgt entweder Verseifung mit KOH unter Zusatz von Pyrogallol oder direkte Extraktion des Homogenates mit Äthanol/Äther 1:1 (s.S.26).

Der Extrakt kann in vielen Fällen direkt zur Messung von Ubichinon mit der Kaliumborhydrid-Reduktion (s.S.34) verwendet werden. Sind noch störende Substanzen vorhanden, was an der Verschiebung der isosbestischen Punkte des Ubichinons bei Reduktion erkennbar wird, so muß eine säulenchromatographische Reinigung des Ubichinons auf Decalso F der Messung vorausgehen.

Methode von Wagner (57)

Die Methode zur Ubichinonbestimmung von Wagner wurde bereits bei der Besprechung der dünn-schichtchromatographischen Methoden (s.S.29) beschrieben. Die quantitative Messung der Ubichinonkonzentration wird auch hier mit Kaliumborhydrid durchgeführt.

Methode von Klingenberg (31)

Große Bedeutung für die Untersuchung der biologischen Rolle von Ubichinon besitzt die Methode von Klingenberg. Der Redoxgrad des mitochondrialen Ubichinons kann mit ihr in verschiedenen Funktionszuständen der Atmungskette bestimmt werden. Dies ge-

schieht einerseits im Doppelstrahlphotometer durch direkte Beobachtung von Mitochondrien-Suspensionen bei Wellenlängen unter 300 μ und gleichzeitig durch chemische Analyse des mitochondrialen Ubichinons. Hierzu wird durch eine Rohrleitung ein Teil der Mitochondrien-Suspension aus der Küvette entnommen und mehrmals mit einem Gemisch aus Petroläther+Methanol 1:1 das Ubichinon extrahiert. (Der Zusatz von Methanol führt zu einer sofortigen Inaktivierung der mitochondrialen Enzyme und damit zur Erhaltung des Ubichinons in dem vorliegenden Reduktionsgrad).

Die quantitative Messung des Ubichinons erfolgt, wie von Crane (44) angegeben mit Kaliumborhydra. Zur Erfassung von reduziertem Ubichinon wird die Suspension mit Eisenchlorid ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in Methanol) behandelt, wodurch das reduzierte Ubichinon oxidiert wird. Anschließend wird mit Kaliumborhydrid reduziert.

Chinonkonzentrationen verschiedener biologischer Systeme

Die Ubichinon- und Vitamin K-Konzentrationen, die von verschiedenen Autoren gefunden wurden, sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengestellt.

Anwendbarkeit der beschriebenen Methoden

Die im Vorangehenden dargestellten Methoden stellen den neuesten Stand der Chinonanalytik dar. Am Beginn der eigenen experimentellen Arbeit ergab sich daher die Frage nach der Anwendbarkeit dieser Methoden zur Messung von Chinonkonzentrationen in Froschherzen.

Es erschien sinnvoll, zunächst Ubichinon in diese Untersuchungen einzubeziehen, denn dieses ist von allen bekannten Chinonen im Herzmuskel in der höchsten Konzentration vorhanden. Den Untersuchungen mußten Arbeiten zur Analytik vorangehen, da bei den bisherigen Verfahren folgende analytische Probleme ungelöst blieben:

1. Extraktion

Etwa 75 % des Ubichinons sind relativ leicht mit organischen Lösungsmitteln zu extrahieren. Der Rest kann erst durch Ver-

Tab. 4 : Ubichinonkonzentrationen in tierischem Gewebe nach den Angaben verschiedener Autoren.

Organ u. Tierart	Lit. Angabe	$\mu\text{Mol/g}$ Feucht- gew.	$\mu\text{Mol/g}$ Trocken- gew.	$\mu\text{Mol/g}$ Protein
<u>Leber</u>				
Ratte	73	0,186		
Rind	74	0,040		
Schwein	74	0,034		
Haifisch	75	0,15		
<u>Herz</u>				
Ratte	73	0,230		
Rind	74	0,085		
Meerschwein- chen	74	0,15		
Lamm	74	0,20		
Kücken	74	0,075		
Frosch	74	0,023		
Affe	75	0,070		
<u>Niere</u>				
Rind	74	0,018		
<u>Nervengewebe</u>				
Frosch (Rana pipiens)	75	0,017		
<u>Muskel</u>				
Lamm	74	0,06		
Kücken	74	0,028		
Frosch	74	0,011		
<u>Mitochon- drien</u>				
Rinderherz	74			2,9-4,0 0,66-1,7
Ratten- leber	74			
<u>Mikroorga- nismen</u>				
Escherichia coli	76		0,35	
Proteus vulgaris	76		0,65	

Tab. 5 : Vitamin K-Konzentrationen in tierischem Gewebe nach den Angaben verschiedener Autoren zusammengestellt
((X) = 30 Vitamin K-Einheiten = 1 μ g).
A = Messung anhand der Extinktion gereinigter Extrakte bei 249 m μ in Cyclohexan.

Material	Lit. Angabe	μ Mol/g Trocken- gew.	μ Mol/g N	Vit.K Einh.(X) je g Trocken- substanz	mg/100g Feucht- gew.	Methode
<u>Leber</u>						
Schwein	69			50		biolog.
Kücken	69			11		"
Dorsch	69			10		"
Schwein	70				0,4-0,8	
<u>Fraktionen aus Rinder- leber</u>						
Zell- kerne	71		0,15			"
Mitochon- drien	71		0,38			"
Überstand	71		0,09			"
<u>Mikroorga- nismen</u>						
E.Coli	72	0,32(K ₂₄₀) 1,30(K ₂₄₅)				A A

Tab. 6 : Verteilung des Vitamin K in verschiedenen Zellfraktionen der Organe eines Kückens. (Nach Vitamin K-freier Ernährung war dem Tier radioaktives Vitamin K verfüttert worden)
K = Kernfraktion, M = Mitochondrien- bzw. Sarkosomenfraktion aus dem Homogenat der Organe (nach Martius (56)).

Organ u. Fraktion	Vit. K μ Mol per g N
Herz	
K	0,151
M	0,86
Leber	
K	0,05
M	0,11
Niere	
K	0,012
M	0,071

seifung unter Pyrogallolschutz freigesetzt werden (46). Dieses Verfahren führt jedoch zu chemischen Veränderungen des Ubichinons, unter Anderem zur Bildung von Ubichromenol (47).

2. Quantitative Messung

Zur quantitativen Messung von Ubichinonkonzentrationen dient die bereits erwähnte Reduktion der Substanz mit Kaliumborhydrid (s.S.34). Die Bestimmung von Ubichinon in Gewebeextrakten ist nach der angegebenen Methode aber nicht ohne Einschränkung möglich, da Begleitstoffe vorkommen können, die ebenfalls mit Kaliumborhydrid reagieren und im Messbereich Extinktionsänderungen hervorrufen. Nach Diplock u. Green (45) können sowohl Extinktionszunahme als auch Extinktionsverminderung durch derartige Verunreinigungen verursacht werden. Crane (44) schlug daher vor, die Gewebeextrakte durch Chromatographieschritte soweit zu reinigen, bis die isosbestischen Punkte des UV-Spektrums der Probe mit denen des reinen Ubichinons übereinstimmen.

Dieses Kriterium bietet jedoch noch keine ausreichende Garantie, daß das Ergebnis einer Ubichinonanalyse durch Begleitstoffe nicht verfälscht sein kann. In eigenen Untersuchungen wurde z.B. festgestellt, daß Vitamin K₁ bis zu einer gewissen Konzentration die Lage der isosbestischen Punkte des Ubichinons nicht verändert, aber die quantitative Bestimmung bereits weitgehend beeinflusst.

Um die Veränderungen des Ubichinonspektrums durch Vitamin K₁ deutlich zu machen, soll zunächst das UV-Spektrum des reinen Ubichinons beschrieben werden (Abb. 3):

Oxydiertes Ubichinon besitzt ein Absorptionsmaximum bei 275 m μ . Die reduzierte Form absorbiert bei 290 m μ , die mit der Reduktion verbundene Extinktionsabnahme ist bei 270-275 m μ am größten. Gleiche Extinktion oder isosbestische Punkte besitzen die beiden Spektren bei 236, 292 und 302 m μ . Isosbestische Punkte und maximale Extinktionsveränderung sind auch aus dem Differenzspektrum der beiden Zustandsformen abzulesen.

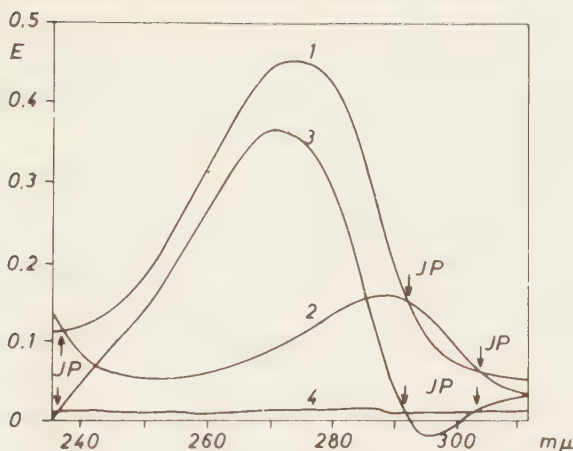


Abb. 3 : UV-Spektren von Ubichinon₅₀ in absol. Äthylalkohol.
 1 = U₅₀ oxydiert. 2 = U₅₀ reduziert. 3 = Differenzspektrum.
 4 = Nulllinie von 3. IP $\approx$ Isosbestische Punkte (236,5
 291,5 302,5 mμ). Ubichinon-Konzentration: 25,125 g/ml.
 Reduktion mit 0,5 % wässriger KBH₄-Lösung (0,01 ml KBH₄/ml
 Cuvetten-Inhalt).

Auch die Extinktion von Vitamin K₁ im Bereich von 275 mμ ändert sich bei Reduktion. Abb. 4 zeigt die Spektren von oxydiertem und reduziertem Vitamin K₁. Absorptionsmaxima der oxydierten Substanz liegen bei 242, 248, 261 und 269 mμ. Reduktion mit Kaliumborhydrid führt zu einem starken Extinktionsanstieg unterhalb von 252 mμ und zu einem Abfall der Extinktion besonders zwischen 260 und 270 mμ. Auch bei 275 mμ zeigt sich noch eine starke Extinktionsverminderung.

Es wäre nun zu erwarten, daß zugesetztes Vitamin K₁ das UV-Spektrum des Ubichinons in genau berechenbarer, konzentrationsabhängiger Weise verändert. Es zeigt sich jedoch, daß das Reduktionsverhalten des Vitamins K₁ durch Ubichinon beeinflusst wird. (Abb. 5). Werden zur Messung des Vitamin K₁-Spektrums der Probencuvette, die Vitamin K₁ enthält und der Referenzcuvette gleiche Mengen von Ubichinon zugesetzt, so ergibt sich,

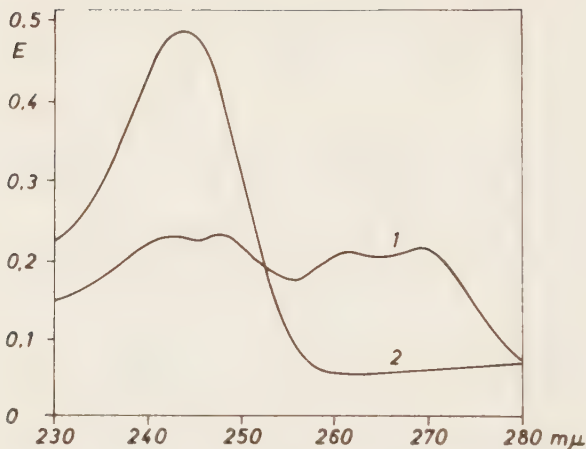


Abb. 4 : UV-Spektren von Vitamin K₁ in absol. Äthylalkohol.
1 = Vitamin K₁ oxydiert. 2 = Vitamin K₁ reduziert.

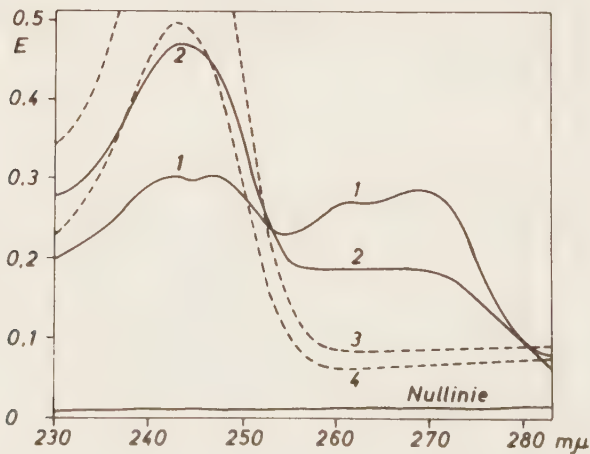


Abb. 5 : UV-Spektrum von Vitamin K₁ bei Gegenwart von Ubichinon₅₀.
Probencuvette: Vitamin K₁ + Ubichinon₅₀; Referenzcuvette: Ubichinon₅₀. Messung in absolutem Äthylalkohol.
Konzentrationen: Vit.K₁: 7,56 g/ml Spektrum Nr. 1-3
5,70 g/ml Spektrum Nr. 4
Ubichinon: 26,38 g/ml
Spektrum 1: Vit.K₁+Ubichinon₅₀ gegen Ubichinon₅₀
2: wie 1 nach Reduktion beider Cuvetten₅₀ mit 0,5% wässriger KBH₄-Lösung (0,01 ml KBH₄/ml)
3 u. 4: Vitamin K₁ reduziert, ohne Ubichinonzusatz.

da die Ubichinonanteile sich eliminieren, zunächst das UV-Spektrum des Vitamin K_1 . Werden nun beide Cuvetten mit Kaliumborhydrid reduziert, so zeigt sich nicht das erwartete Spektrum des reduzierten Vitamin K_1 (gestrichelte Kurven der Abb. 5), sondern ein Mischspektrum aus oxydiertem und reduziertem Vitamin K_1 .

Die Reduktion von Vitamin K_1 in Gegenwart von Ubichinon ergibt Schwankungen der Analysenresultate. Das stärkere Oxydationsmittel Ubichinon (3×10^{-2} molar) verhindert die vollständige Reduktion des Vitamins K_1 (6×10^{-3} molar) durch KBH_4 obwohl KBH_4 in großem Überschuß vorhanden ist. Daher führt der Zusatz von Vitamin K_1 zu verschiedenen Veränderungen des UV-Spektrums der Ubichinonlösung.

In dem Experiment, welches der Abb. 6 zugrunde liegt, ergab sich bei einem molaren Verhältnis von Vitamin K_1 : Ubichinon wie 1:6 (17 mol% K_1) ein Fehler der Ubichinonbestimmung von ca. + 7 %, ohne daß eine Verschiebung der isosbestischen Punkte die Beimengung von Vitamin K_1 anzeigte. Erst bei einem größeren molaren Anteil von K_1 verschob sich der isosbestische Punkt bei 236 $\text{m}\mu$ ins Langwellige. Die isosbestischen Punkte bei 292 und 302 $\text{m}\mu$ stimmten auch dann noch mit denen des reinen Ubichinons überein.

Da die Verschiebung des isosbestischen Punktes des Ubichinons bei 236 $\text{m}\mu$ nicht genau proportional der Konzentration an Vitamin K_1 ist, wurde versucht, die Verschiebung des isosbestischen Punktes zu dem Fehler der Ubichinonmessung, welcher durch die Beimengung von Vitamin K_1 hervorgerufen wird, in Beziehung zu setzen. Diese Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

Trotz der großen Streubreite der Ergebnisse, zeigt sich eindeutig, daß bis zu einem Fehler der Ubichinonbestimmung von 10 % nicht mit einer signifikanten Verschiebung des isosbestischen Punktes zu rechnen ist.

Es wurde bereits erwähnt (s.S. 12), daß Vitamin K_1 im Gewebe nicht in chemisch messbarer Konzentration vorkommt. Begleitstoffe aus Gewebsextrakten aber, die sich wie Vitamin K_1 verhalten, können in der angegebenen Weise die Spezifität der

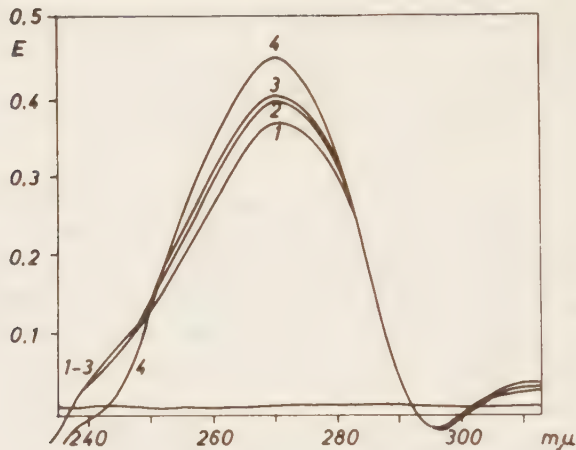


Abb. 6 : Isosbestische Punkte von oxydiertem und reduziertem Ubichinon₅₀ bei verschiedenen Konzentrationen von Vitamin K₁. Aufzeichnung des Differenzspektrums; Messung in absolutem Äthylalkohol. Reduktion der Chinone in der Referenzcuvette mit 0,5 % wässriger KBH₄-Lösung (0,01 ml KBH₄/ml).

Spektrum NR	29,1 n Mol U ₅₀ /ml + x n Mol K ₁ /ml	Molare Relation K ₁ : U ₅₀	Mol % K ₁
1	0	0	0
2	1,67	1 : 17,4	5,73
3	5,00	1 : 5,8	17,2
4	8,29	1 : 3,5	28,5

Nachweisreaktion für Ubichinon beeinträchtigen, und es ist nicht ohne weiteres überschaubar, in wie weit Stoffe dieser Art in den zur Analyse verwendeten Gewebeextrakten vorkommen. Auch das Kriterium der isosbestischen Punkte bietet keinen ausreichenden Schutz vor derartigen Fehlerquellen.

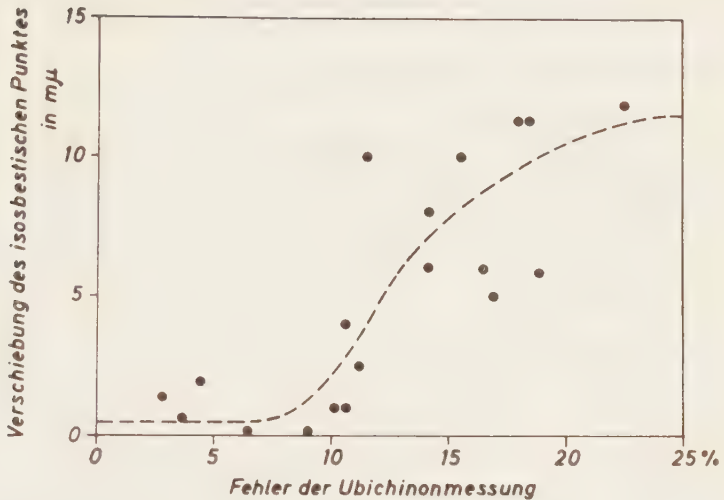


Abb. 7: Zusammenhang zwischen dem Fehler der Ubichinonmessung und der Verschiebung des isosbestischen Punktes bei 236 m μ unter Einfluß von Vitamin K₁.

Aufgrund der hier dargestellten Probleme der Ubichinonanalytik wurde eine Modifikation der Bestimmungsmethode erarbeitet, die folgende Forderungen berücksichtigt:

a) Quantitative Extraktion aus dem Gewebe.

b) Spezifische Bestimmung mittels einer so weitgehenden chromatographischen Abtrennung des Ubichinons aus Gewebeextrakten, daß alle Reinheitskriterien der Chromatographie, der UV-, Infrarot- und Massenspektrometrie erfüllt sind.

Bestimmung von Ubichinon in Herzmuskelgewebe

A. Voruntersuchungen (Kalbsherz)

a) Gewebeextraktion

Zur quantitativen und schonenden Extraktion von Ubichinon aus dem Gewebe wurden folgende Aufschlußverfahren angewandt:

1. Der enzymatische Aufschluß eines Gewebshomogenates,
2. Der Aufschluß von lyophilisiertem Gewebstrockenpulver mit Ultraschall.

1. Enzymatischer Aufschluß

Zunächst wurde ein enzymatischer Aufschluß des lyophilisierten Rinderherztrockenpulvers mit Pankreas-Stabil (Fa. Boehringer) versucht, einem Präparat, welches Protease-, Amylase- und Lipase-Aktivität besitzt (Proteasen 100 000 Baumann-Einheiten/g, Amylasen 2 080 000 Wohlgemut-Einheiten/g, Lipasen 12 Willstätter-Einheiten/g):

Ein Gramm Rinderherztrockenpulver wurde mit 40 ml 0,025 m Phosphatpuffer (pH 7,7) und 0,5 g Enzympulver im Potter homogenisiert und bei 37° C 2 Stunden inkubiert. Nach einer Eiweiß-fällung mit Trichloressigsäure wurde der Ansatz 3mal mit ca. 40 ml Cyclohexan extrahiert. Diese Methode brachte jedoch keine Verbesserung der Extraktionsbedingungen.

2. Aufschluß mit Ultraschall

Man kann die gebräuchlichen Methoden der Gewebshomogenisation einteilen nach der Energie, die hierbei auf das zu zerkleinernde Gewebe wirkt. Diese ist abhängig von der Leistung des Homogenisators und dem Wirkungsgrad, mit dem die Energie auf das Homogenat übertragen wird.

Da sich bei den gängigen Homogenisationsmethoden (44, 45) keine quantitative Extraktion des Ubichinons aus dem Gewebe erreichen läßt und auch der enzymatische Aufschluß keinen Fortschritt gebracht hatte, erschien es angebracht, die hohe Leistung eines Ultraschall-Disintegrators auszunutzen, insbesondere, da sich seine Energie über den Schwingstab, der in das Material eingeführt wird, mit hohem Wirkungsgrad auf die zu

extrahierenden Partikel übertragen läßt. Als geeignetes Gerät erwies sich hierzu der 50 W leistende M.S.E. Ultrasonic-Disintegrator mit einer Arbeitsfrequenz von 20 000 Herz. Die Extraktion wird folgendermaßen durchgeführt:

100 bis 500 mg lyophilisiertes Gewebestrockenpulver (s.S.58) werden in einem Potter-Homogenisator mit Glaskolben unter Zusatz von 20 ml n-Heptan homogenisiert und anschließend 3mal 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Probe wird während der Beschallung in Eis gekühlt. Nach jeder Beschallung wird abzentrifugiert und das Lösungsmittel erneuert. Nach der letzten Beschallung wird 3mal mit n-Heptan nachgewaschen.

Die gesammelten Extrakte werden im Rotationsverdampfer bei 40° C im Vakuum eingengt.

Wie auf S.61 ausgeführt ist, werden mit dieser Extraktionsmethode 95 % des vorhandenen Ubichinons aus dem Gewebe entfernt.

b) Chromatographie des Gewebeextraktes

Der unter Ultraschalleinwirkung hergestellte Gewebeextrakt enthält neben Ubichinon eine große Anzahl von Begleitstoffen. Zur Reindarstellung des Ubichinons wurde daher ein System von vier aufeinanderfolgenden Chromatographieschritten erarbeitet. Es ermöglicht sowohl die Abtrennung der Beistoffe, als auch eine Auftrennung der im Gewebeextrakt vorkommenden Chinonderivate.

Säulenchromatographie (System 1)

Den ersten Trennschritt bildet eine Säulenchromatographie auf Kieselgel H (Merck) in Säulen von 15 x 60 mm. Das Adsorbens wird als n-Heptan-Suspension eingefüllt. Die Probe ist zum Auftrag in 1 ml n-Heptan gelöst. Die Chinone werden als einheitliche Fraktion mit 25 ml n-Heptan-Aceton 90:10 eluiert.

Dünnschichtchromatographie

Durch die Säulenfraktionierung wird eine starke, polare Lipidfraktion abgetrennt. Das Eluat aus der Säule enthält dadurch bereits eine relativ hohe Konzentration an Ubichinon und kann nun auf Dünnschichtchromatographieplatten übertragen werden.

Um einen geeigneten Trenngang für die verschiedenen Chinone aufzubauen, war es notwendig, in Vorversuchen einen Überblick über die Trenneigenschaften verschiedener Lösungsmittelgemische zu bekommen.

Die diesbezüglichen Versuche wurden mit Reinsubstanzen durchgeführt. Als Adsorbens diente gereinigtes Kieselgel HF₂₅₄ (s. Methodik S. 25), welches auf Platten von 20 x 20 cm in 0,15 mm Schichtdicke aufgetragen wurde.

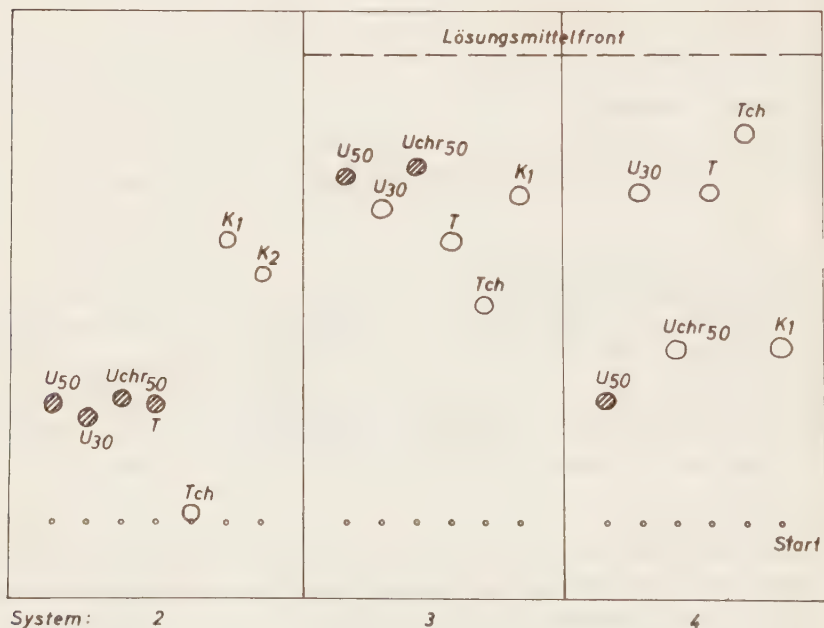


Abb.8 : Dünnschichtchromatographie von Chinonen auf Kieselgel-HF.
Trennsysteme: System 2: n-Heptan-Aceton 98:2. Durchlauf-254.
chromatographie 90 Min. System 3: Benzol-Methanol 98:2.
System 4: Paraffinölmprägung der Platte. Trennung der
Chinone: Aceton-paraffinölgesättigtes H₂O 90:10. Ent-
fernung des Paraffins: Durchlaufchromatographie in Petrol-
äther (40-60°). Sichtbarmachung der Flecken: Besprühen
mit konz. H₂SO₄ und 10 Min. Erhitzen auf 110° C.
Abkürzungen: U₄₀(30) = Ubichinon₅₀(bzw.30);
Uchr₅₀ = Ubichromenol₅₀; T = α-Tocopherol;
Tch = α-Tocopherylchinon;
K₁(2) = Vitamin K₁(bzw.2)

1. (System 2)

Als Laufmittel dient das Gemisch n-Heptan-Aceton 98:2. Die Trennung erfolgt im Durchlauf 90 Minuten. Abb.8 zeigt am Beispiel der Chromatographie reiner Chinone, daß die Vitamine K_1 und K_2 sowie α -Tocopherylchinon abgetrennt werden, während die übrigen Stoffe, einschließlich der Ubichinone in einer Fraktion wandern.

2. (System 3)

Lösungsmittelgemisch: Benzol-Methanol 98:2 (50). Das System erlaubt die Abtrennung von α -Tocopherol, α -Tocopherylchinon und Ubichinon₃₀, während Ubichinon₅₀, Ubichromenol₅₀ und Vitamin K_1 in einer Fraktion wandern (Abb.8).

Variationen des Systems 3:

Durch Variation des Methanolgehaltes wurde versucht, die Auftrennung der Chinone zu verbessern (Abb.9). Eine wesentliche Änderung der Trenneigenschaften des Systems war jedoch weder durch Erhöhung des Methanolgehaltes auf 6 % noch durch Erniedrigung auf 0,5 % zu erreichen.

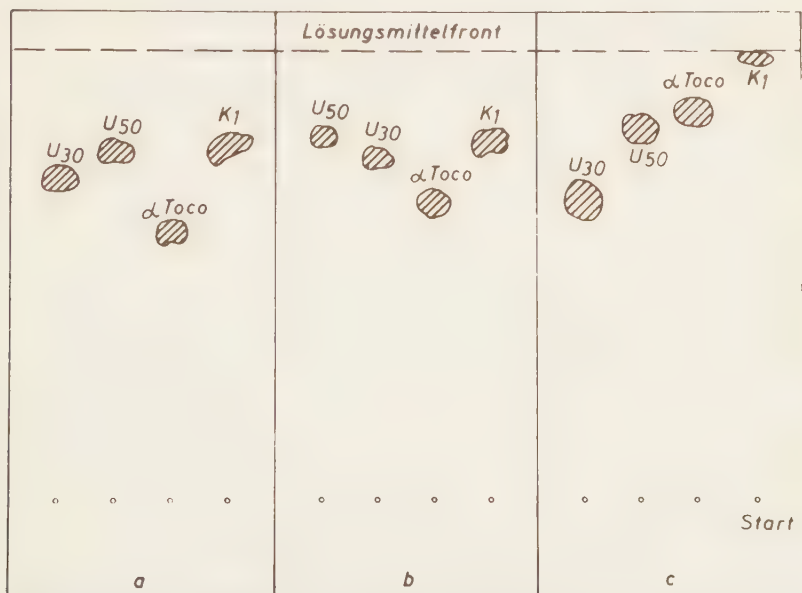


Abb.9 : Dünnschichtchromatographie von Chinonen. Variation von System 3. a: Benzol-Methanol 94:6; b: Benzol-Methanol 98:2 (System 3); c: Benzol-Methanol 99.5:0.5.

3. (System 4) (58)

Die Chromatographie wird auf Platten durchgeführt, deren Kieselschicht mit 5 % Paraffinöl in Petroläther imprägniert wurde. Als Laufmittel dient das Gemisch Aceton-paraffinölgesättigtes Wasser 90:10. Zur vollständigen Entfernung des Paraffinöles nach der Auftrennung wird eine Durchlaufchromatographie in Petroläther (40 - 60°) angeschlossen. Hierbei bleibt die Lage der Chinone unverändert, während das Paraffinöl mit dem Lösungsmittel wandert.

Variationen des Systems 4:

Auch bei System 4 war durch die verwendete Variation keine Verbesserung des Ergebnisses zu erzielen (Abb. 10). Die Auseinandertrennung von Ubichinon₃₀ und α -Tocopherol ist auch im Gemisch Aceton-H₂O 95:5 nicht zu erzielen, Ubichinon₅₀ kann von Vitamin K₁ nur im ursprünglich verwendeten System Aceton-H₂O 90:10 getrennt werden.

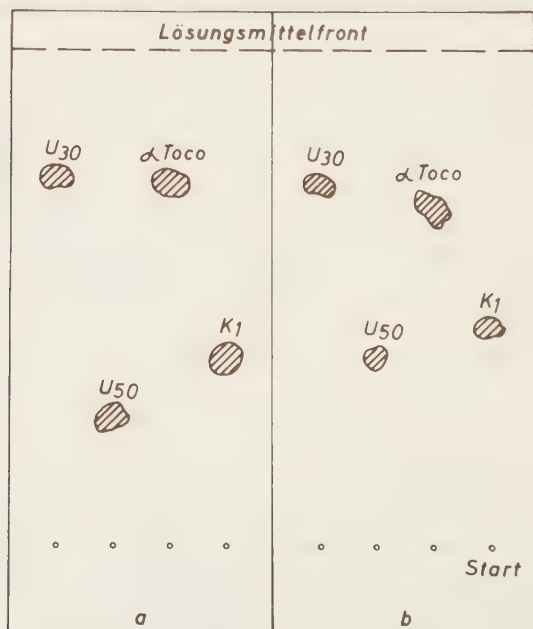
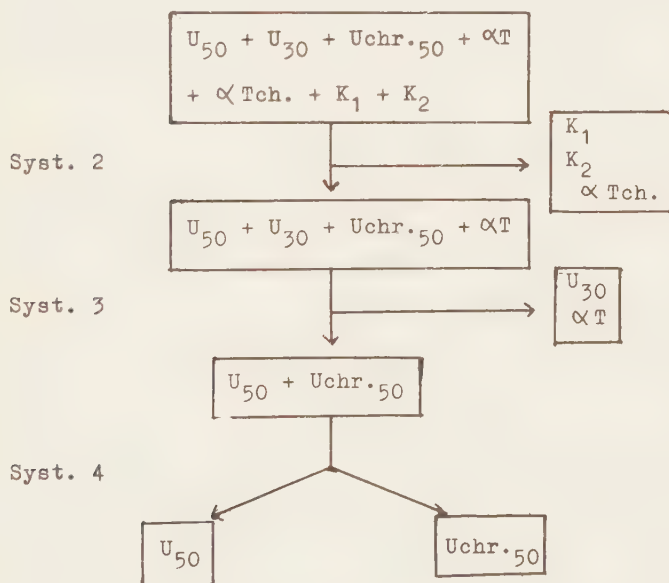


Abb. 10 : Dünnschichtchromatographie von Chinonen. Variation von System 4. Paraffinimprägnierung der Platte.
a: Aceton-paraffinölgesättigtes H₂O 90:10 (System 4);
b: Aceton-H₂O 95:5.

Zur Aufstellung eines mehrstufigen Trennganges für biogene Chinone standen die Systeme 2, 3 und 4 zur Verfügung. Jedes System bietet für sich die Möglichkeit, einzelne Chinone oder Gruppen von Chinonen von anderen abzutrennen (Abb.8). Die Kombination der Systeme in der Reihenfolge 2, 3 und 4 erlaubt es, insbesondere Ubichinon₅₀ schrittweise von allen übrigen Chinonen zu reinigen. Die stufenweise Reindarstellung des Ubichinons ist in Tab.7 dargestellt.

Tab.7 : Auftrennung eines Chinongemisches mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie. U_{50} , U_{30} = Ubichinon₅₀ bzw. 30; $Uchr.50$ = Ubichromenol₅₀; αT = α -Tocopherol; α -Tch. = α -Tocopherylchinon; K_1 = Vitamin K_1 ; K_2 = Vitamin K_2 .



System 2:

Von der geschlossen aus System 1 eluierten Chinonfraktion werden nun die Vitamine K_1 und K_2 , sowie α -Tocochinon abgetrennt, während die übrigen Stoffe, einschließlich der Ubichinone, in einer Fraktion wandern. Diese Fraktion wird zur weiteren Auftrennung dem Chromatogramm entnommen (s.S. 60 ff.).

System 3:

Von der aus System 2 entnommenen Fraktion werden Ubichinon₃₀ und α -Tocopherol abgetrennt. Die noch nicht ausreichend getrennten Stoffe, Ubichinon₅₀ und Ubichromenol₅₀ werden gemeinsam eluiert und auf das System 4 übertragen.

System 4:

Die aus System 3 entnommene Fraktion wird so weitgehend aufgetrennt, daß Ubichinon₅₀ wie auch andere Ubichinonhomologe in reiner Form erhalten und durch Umsatz mit Kaliumborhydrid quantitativ bestimmt werden können.

c) Erfassung von reduziertem Ubichinon

Da Ubichinon in den Mitochondrien an den Redoxreaktionen der Atmungskette teilnimmt (30, 31), muß mit dem Vorkommen von reduziertem Ubichinon in Gewebeextrakten gerechnet werden.

Zur Erfassung von reduziertem Ubichinon empfiehlt Crane (44) Überführung der Substanz in die oxydierte Form, was die Messung mit KBH_4 ermöglicht. Dies kann in äthanolischer Lösung durch Schütteln mit Silberoxyd und einstündiges Stehenlassen der Suspension erreicht werden.

Aus technischen Gründen schien es vorteilhaft, die Oxydation des Ubichinols im Extraktionsansatz vorzunehmen. Daher mußte geprüft werden, ob der Vorgang auch in n-Heptan abläuft. Hierzu wurde Ubichinon in Gegenwart von Äthanol reduziert, in der reduzierten Form in n-Heptan aufgenommen und in n-Heptan mit Silberoxyd reoxydiert:

95g Ubichinon₅₀ wurden in 4 ml n-Heptan + 2 ml Äthanol absolut gelöst und durch Zusatz von 0,05 ml KBH_4 -Lösung (0,5 % in H_2O) reduziert. Der Ansatz wurde quantitativ in einen wassergefüll-

ten Scheidetrichter überführt. Nach mehrmaligem Schütteln wurde das Wasser zur Entfernung des Kaliumborhydrids 2mal erneuert. Die Lösungsmittelphase wurde über Na_2SO_4 anhydric. getrocknet und eingengt. Die in dieser Weise aufbereitete Probe wurde in 5 ml n-Heptan gelöst. Sie zeigte das UV-Spektrum des reduzierten Ubichinons (Abb. 11). Zur Reoxydation wurde die Probe in ca. 10 ml n-Heptan aufgenommen. Nach Zugabe von einer Spatelspitze Ag_2O blieb die Probe bei Zimmertemperatur 1 Stunde stehen, wurde dann abzentrifugiert und das sedimentierte Ag_2O mit n-Heptan nachgewaschen. Die Probe wurde eingengt und mit Äthanol absolut ad 5 ml aufgenommen. Das UV-Spektrum zeigte die Charakteristika des oxydierten Ubichinons (vgl. Abb. 3). Die Probe wurde anschließend mit Kaliumborhydrid reduziert und quantitativ gemessen.

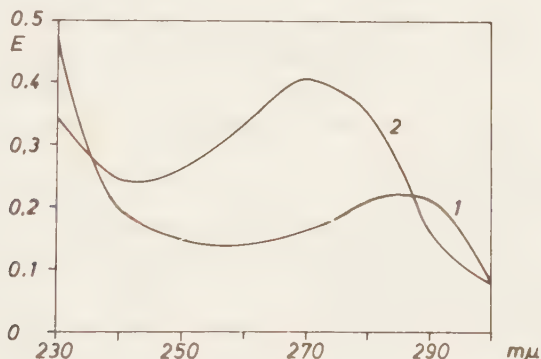


Abb. 11 : UV-Spektrum von Ubichinon₅₀. 1 = Ubichinon₅₀ reduziert in n-Heptan-Äthanol 2:1, Spektrum aufgenommen nach Überführung in reines n-Heptan. 2 = Ubichinon₅₀ reoxydiert mit Ag_2O in n-Heptan, Spektrum aufgenommen in Äthanol.

Tab.8 zeigt, daß die Reoxydation des Ubichinols quantitativ auch in n-Heptan durchgeführt werden kann. Eine Veränderung des Ubichinonmoleküls in der Seitenkette wurde durch chromatographische Untersuchung der Reaktionsprodukte ausgeschlossen. In den analytischen Systemen 2, 3 und 4 (s. Methodik der Ubichinon-analyse S.57 ff.) wurden nebeneinander eine Leerprobe, welche

Tab. 8 : Recovery von Ubichinon₅₀ bei Oxydation in n-Heptan-Äthanol 2:1 und Reoxydation mit Ag₂O in n-Heptan. Erläuterungen im Text.

Nr.	Ubichinon ₅₀ eingesetzt	in 8/5 ml wiedergefunden	wiedergefunden Menge in %	Abweichung in % (= d) vom arithmetischen Mittel
1	95	91,5	96,5	- 0,4
2	95	92,3	97,2	+ 0,3
3	95	91,9	96,7	- 0,2
4	95	92,3	97,2	+ 0,3
Mittel:			96,9	

Abweichung des gefundenen arithmetischen Mittelwertes von der gegebenen Menge: - 3,1 %

Mittlere Abweichung einer Einzelbeobachtung vom Mittelwert:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{d^2}{n-1}} = \pm 0,36 \%$$

der Reduktion und Reoxydation in n-Heptan ausgesetzt war, eine ebenso behandelte Probe von Ubichinon₅₀ und eine unbehandelte Ubichinonprobe derselben Charge chromatographiert. Die aufgetrennten Fraktionen wurden durch Besprühen mit konzentrierter H₂SO₄ und 20 Minuten Erhitzen auf 110° C sichtbar gemacht.

Abb. 12 zeigt, daß in den 3 Systemen von dem reoxydierten Ubichinon keine Komponenten abgetrennt werden, die nicht auf die Leerprobe bzw. das eingesetzte Ubichinon zurückgeführt werden können. Die Trenneigenschaften des Ubichinons werden durch die Behandlung nicht verändert. Reduziertes Ubichinon kann demnach auch in n-Heptan quantitativ oxydiert werden. Die Erfassung von Ubichinol in Gewebe ist also dadurch möglich, daß dem Extraktionsmittel n-Heptan Ag₂O zugesetzt wird.

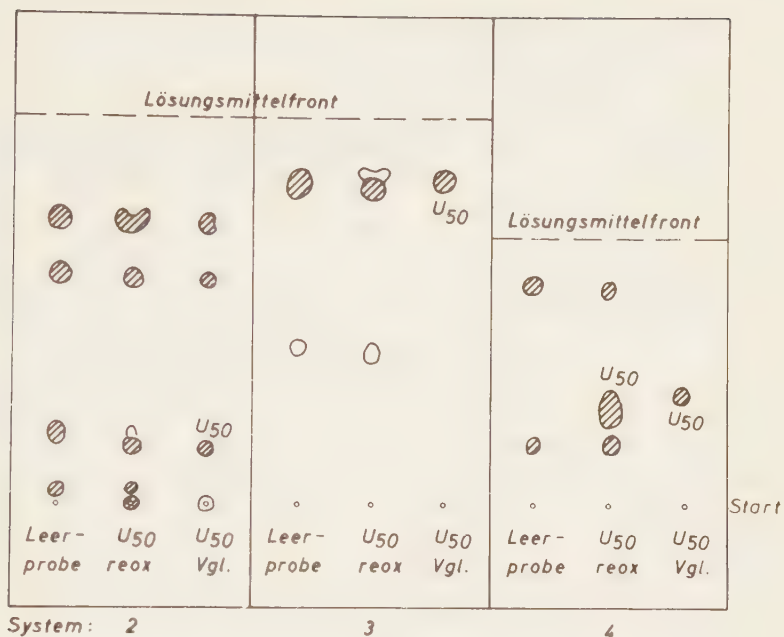


Abb. 12 : Chromatographie der Produkte der Reoxydation von reduziertem Ubichinon₅₀ mit Ag₂O in n-Heptan.
 System 2: n-Heptan-Aceton 98:2; System 3: Benzol-Methanol 98:2; System 4: Aceton-paraffinölgesättigtes H₂O 90:10. Sichtbarmachung der Fraktion durch Besprühen mit konz. H₂SO₄ und 20 Min. Erhitzen auf 110° C.

d) Recovery-Versuch über die Einzelsysteme

Durch sog. Recovery-Versuche wurde nun die Verwendbarkeit der vier chromatographischen Systeme für eine quantitative Ubichinon-analytik geprüft. Es wurde festgestellt, wieviel von einer eingesetzten Menge (44-132 µg) Ubichinon nach Durchlaufen von jeweils einem Trennsystem zurückgewonnen werden. Aus Tab.9 ist zu entnehmen, daß bei den einzelnen Trenngängen zwischen 97,7 und 102 % der zugegebenen Menge wiedergefunden werden und somit jeder Trenngang für sich eine quantitative Bestimmung von Ubichinon gewährleistet.

Tab. 9 : Recovery-Versuch mit Ubichinon₅₀ bei Chromatographie über die Einzelsysteme.

Trennsystem	Ubichinon ₅₀ in δ		Wiederge- fundene Menge in %	Abweichung in % (= d) v. arithm. Mittel	Abweichung des gefun- denen arithm. Mittelwert v.d. geg. Menge in %	Mittlere Ab- weichung einer Einz. beobachtung vom Mittel- wert $\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$
	einge- setzt	wieder- gefunden				
1 (Säule)	74,5	73,9 72,9 73,9 <u>99,2</u> Mittel: 98,8	99,2 97,9 <u>99,2</u> Mittel: 98,8	+ 0,4 - 0,9 + 0,4	- 1,2	$\pm 0,75 \%$
<u>Dünnschicht- chromato- graphie:</u> 2 n-Heptan- Aceton 98:2	132,0	134,5 136,3 133,1 <u>100,8</u> Mittel: 102,0	101,9 103,3 <u>100,8</u> Mittel: 102,0	- 0,1 + 1,3 - 1,2	+ 2,0	$\pm 1,25 \%$
3 Benzol- Methanol 98:2	132,0	138,4 130,3 129,6 <u>98,2</u> Mittel: 100,6	104,8 98,7 <u>98,2</u> Mittel: 100,6	+ 3,2 - 1,9 - 2,4	+ 0,6	$\pm 3,1 \%$
4 paraffinöl- impr. Platte Aceton-par. ges. H ₂ O 90:10	44,7	43,7 43,3 44,0 <u>98,4</u> Mittel: 97,7	97,8 96,9 <u>98,4</u> Mittel: 97,7	+ 0,1 - 0,8 + 0,7	- 2,3	$\pm 0,75 \%$

B. Methodik zur Ubichinonanalyse

Die durch die oben beschriebenen Vorversuche ausgearbeitete Methode der Chinonanalyse soll nun zusammenfassend beschrieben werden.

Benötigte Geräte und Materialien

a) Geräte

Kühlzange nach Wollenberger (68)
Lyophilisator (Vakuum von 50 Millitorr)
Ultraschallgerät z.B. M.S.E. Ultrasonic-Disintegrator
Chromatographieröhren 15 x 250 mm
Ausstattung zur Dünnschichtchromatographie
Chromatographieplatten 20 x 20 cm
Desaga-Fleckeneluator
Quarzcuvetten Schichtdicke 1 cm
UV-Spektrophotometer

b) Materialien

flüssiger Stickstoff

Ag₂O

Lösungsmittel:

n-Heptan für Chromatographie

Aceton p.A.

Benzol p.A.

Methanol p.A.

Petroläther 40-60°

Adsorbentien:

Kieselgel H (Merck)

Kieselgel HF₂₅₄ (Merck)

Paraffinöl dickflüssig (Merck Nr. 7160)

c) Vorbereitung der Adsorbentien und Lösungsmittel

Lösungsmittel:

Alle Lösungsmittel werden vor Gebrauch doppelt destilliert.

Reinigung von Kieselgel HF₂₅₄ zur Dünnschichtchromatographie:
1 kg Kieselgel HF₂₅₄ wird 3mal 1 Stunde mit 5 l Petroläther-Methanol 90:10 gerührt und jeweils auf einer Filternutsche das Lösungsmittel abgesaugt. Nachwaschen mit H₂O dest. und Trocknen bei 90° C (12 Std.).

Herstellung der Chromatographieplatten:

Das gewaschene Kieselgel HF₂₅₄ wird in einem Potter-Homogenisator mit Flexiglas Kolben vorsichtig mit Wasser zu einer dünnflüssigen Suspension verrührt. Sie wird auf Platten von 20x20 cm in 0,15 mm Schichtdicke aufgetragen. Die Platten werden ca. 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschließend bei 100° C getrocknet.

Durchführung der Ubichinonbestimmung (Tab. 10)

a) Ausgangsmaterial

Von dem zu analysierenden Material werden Fascien und Fett abpräpariert, das Gewebe in kleine Stücke geschnitten und mit einer Kühlzange (Wollenberger (68)), deren Aluminiumbacken in flüssigem Stickstoff vorgekühlt sind, zusammengepreßt und kann nun mühelos in einer Reibschale mit flüssigem N₂ zermörsert werden. Das hierbei erhaltene Pulver wird solange lyophilisiert, bis in einem Vakuum von 50 Millitorr bei Gegenwart von Trockengel unter Zimmertemperatur keine Gewichtsabnahme mehr zu verzeichnen ist.

b) Extraktion

100 - 500 mg lyophilisierten Gewebetrocknenpulvers werden in einem Potter-Homogenisator mit Glaskolben unter Zusatz von 20 ml n-Heptan homogenisiert und nach Zusatz von einer Spatelspitze Ag₂O 3mal 10 Minuten mit Ultraschall behandelt (50 W, 20 000 Herz). Die Probe wird während der Beschallung mit Eis gekühlt. Nach jeder Beschallung wird abzentrifugiert (3800 Upm) und das Lösungsmittel erneuert. Nach der letzten Beschallung wird 3mal mit n-Heptan nachgewaschen. Die gesammelten Extrakte werden im Wasserstrahl-Vakuum bei 40° C eingengt.

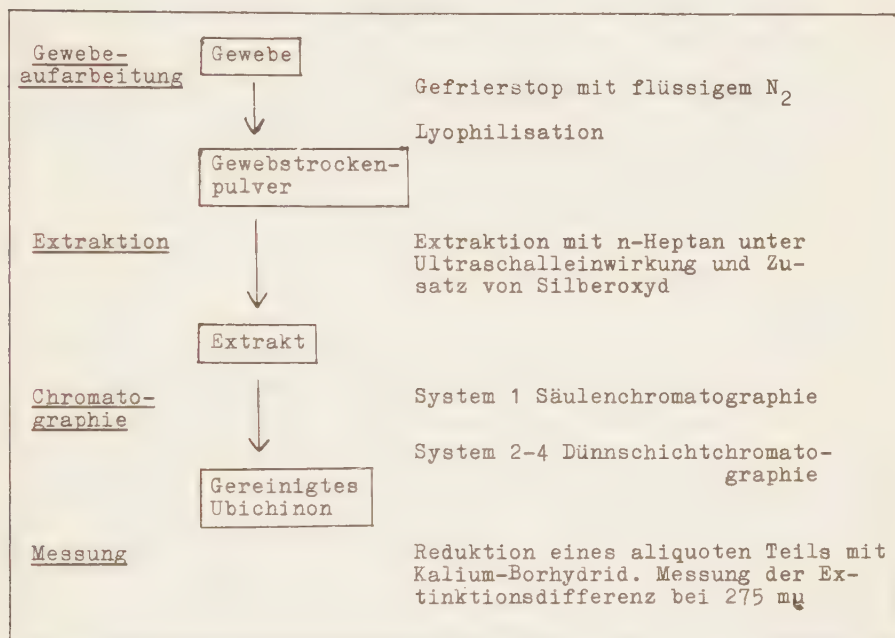
c) Trenngang:

1. Säulenchromatographie (System 1)

Herstellung der Säule:

Eine Glasröhre (15 mm Innendurchmesser) wird an ihrer konisch zulaufenden Spitze mit Zellstoff verschlossen. Kieselgel H wird in n-Heptan (5-fache Menge v, v) suspendiert, durch Anlegen eines Vakuums entlüftet und 60 mm hoch in die Säule einpipettiert.

Tab.10 : Analysengang zur Bestimmung von Ubichinon₅₀ in Herzmuskulatur. System 2: n-Heptan-Aceton 98:2, Durchlauf 90 Minuten. System 3: Benzol-Methanol 98:2. System 4: Paraffinimprägnierung der Platte, Aceton-paraffinölgesättigtes H₂O 90:10.



Im Verlauf der weiteren Vorbereitung sedimentiert die Kieselgelsäule auf eine Höhe von 45 - 50 mm. Nach Durchlauf des überschüssigen n-Heptans wird die Säule mit 10 ml Aceton und anschließend mit 20 ml n-Heptan gewaschen.

Aufbringen der Probe:

Die Probe wird auf die Säule in 1 ml n-Heptan gelöst aufgetragen.

Elution:

Die Elution der Probe erfolgt mit 25 ml n-Heptan-Aceton 90:10. Die Elutionsgeschwindigkeit wird durch die Korngröße des Adsorbens bestimmt. Das Eluat wird bei 40° C im wasserstrahl-Vakuum eingengt.

2. Dünnschichtchromatographie

Auftrag der Proben und Elution:

Die Proben werden in 0,5 - 1 ml Petroläther gelöst und quantitativ an der Startzone aufgetragen. Der Auftrag erfolgt punktförmig oder, bei größeren Extraktmengen, streifenförmig, um eine Überladung der Platte zu vermeiden (s. Abb. 13).

Zur Elution werden die Fraktionen mit dem Desaga-Fleckeneluator abgesaugt. Zur quantitativen Erfassung des gesamten Kieselgels wird nach dem ersten Arbeitsgang eine kleine Menge unbeladenen Kieselgels auf die Zone gebracht, und mit einem Spatel mit dem Rest verrieben und abgesaugt. Dieser Vorgang wird 2mal wiederholt. Zur Extraktion der Fraktion aus dem Kieselgel werden ca. 20 ml des Gemisches Petroläther-Methanol 90:10 verwendet.

System 2:

Das Eluat aus System 1 (Säule) wird vollständig und quantitativ auf die Platte aufgetragen. Laufmittel: n-Heptan-Aceton 98:2. Durchlaufchromatographie 90 Minuten. Zur Erzielung eines guten Lösungsmitteldurchlaufs kann am Oberrand der Platte ein Streifen Zellstoff befestigt werden, der das Lösungsmittel ansaugt.

System 3:

Die Ubichinonfraktion aus System 2 wird zur weiteren Chromatographie quantitativ auf eine neue Platte übertragen. Zur Trennung dient ein Lösungsmittelgemisch Benzol-Methanol 98:2.

System 4:

Die Chromatographie wird auf Platten durchgeführt, deren Kieselgelschicht durch Eintauchen in 5 % Paraffinöl in Petroläther bei anschließender Lufttrocknung imprägniert wurde (59). Als Laufmittel dient das Gemisch Aceton-paraffinölgesättigtes Wasser 90:10. Zur vollständigen Entfernung des Paraffinöls nach der Auftrennung wird eine Durchlaufchromatographie in Petroläther (40-60°) angeschlossen (90 Minuten). Hierbei bleibt die Lage der Chinone unverändert, während das Paraffinöl mit dem Lösungsmittel wandert.

Die Ubichinonfraktion wird aus diesem System mit Petroläther-Methanol 90:10 eluiert, eingeengt und der quantitativen Bestimmung zugeführt.

d) Quantitative Bestimmung

Für die quantitative Bestimmung von Ubichinon werden die aus System 4 eluierten Proben in 5 ml absolutem Äthylalkohol gelöst. Die Messung erfolgt in Quarzcuvetten bei 275 mμ im Beckman DU Spektrophotometer bzw. im Beckman DK 2 A gegen reinen Äthylalkohol. Nachdem die Extinktion der oxydierten Probe festgestellt ist, wird mit 0,5 %iger KBH_4 -Lösung (0,01 ml KBH_4 /ml Cuvetteninhalt) reduziert und der Endwert nach 2 Minuten abgelesen. Die Berechnung erfolgt anhand des Coeffizienten:

$$\Delta E \begin{matrix} 1 \% \\ 1 \text{ cm ox. - red. } 275 \text{ m}\mu \end{matrix} = 142$$

C. Kriterien für die quantitative und spezifische Durchführbarkeit der modifizierten Ubichinonanalyse.

1. Extraktion aus dem Gewebe

Der Vorteil der Extraktion des Gewebstrockenpulvers mit n-Heptan besteht in der Vermeidung jeglicher chemischen Veränderung des Ubichinons. Die zusätzliche Anwendung von Ultraschall gewährleistet die quantitative Durchführbarkeit der Extraktion.

Unter Anwendung der von Crane (44) beschriebenen Gewebeverseifung (s.S. 26) unter Pyrogallolschutz konnte festgestellt werden, daß in dem extrahierten Geweberückstand nur noch 4,6 % des gesamten Ubichinongehaltes vorhanden waren (Tab. 11). Bei der Berechnung dieses Wertes wurde bereits berücksichtigt, daß auch bei schonenster Durchführung der Verseifung ca. 30 % Ubichinon zerstört werden (Tab. 12). Berechnet man 4,6 % als effektiven Ubichinonrückstand an, dann würden somit durch die Ultraschallextraktion 95,4 % der Verbindung aus dem Gewebe entfernt.

Tab. 11 : Extraktion von Ubichinon₅₀ aus Kalbsherztrockenpulver. Vergleich der Ausbeute der Extraktion mit n-Heptan unter Einwirkung von Ultraschall mit dem durch Verseifung aus dem extrahierten Rückstand freigesetzten Anteil. Die Werte der Verseifungsanalyse wurden wegen des hierbei auftretenden Verlustes von 30 % mit dem Faktor 1,43 multipliziert (s.Tab.12); a und b: Doppelbestimmung aus einer Charge.

Ubichinon ₅₀ aus Kalbsherz in g/g Trockenpulver					
NR	Extraktion	Verseifung des extr. Trockenpulvers	Gesamtgehalt an Ubichinon	% des extrahierten Anteils am Ges.Ubich.	
1	a	518	26,2	544,2	95,2
	b	518	25,9	543,9	95,2
2	a	768	36,0	804,0	95,5
	b	768	35,1	803,1	95,6
Mittel:					95,4

2. Identität und Reinheit der Ubichinonfraktion

Chromatographische Kriterien

Abb. 13 zeigt die Dünnschichtchromatographie eines Extraktes aus Kalbsherz nach dem in Tab. 10 geschilderten Schema. Es ist zu sehen, daß die aus System 1 entnommene Fraktion mit System 2 in 5 weitere Fraktionen aufgetrennt wird, von denen eine den Ubichinonanteil des Extraktes enthält. Diese Fraktion wird durch Abtrennung von je einer Nebenfraktion mit den Systemen 3 und 4 so weitgehend gereinigt, daß sie sich bei ihrer Rechromatographie mit den Systemen 2, 3 und 4 völlig einheitlich verhält (Abb.). Bezüglich ihrer chromatographischen Eigenschaften zeigt sie völlige Übereinstimmung mit Ubichinon₅₀. Sie konnte kristallisiert erhalten werden und stand in dieser Form für weitere Analysen zur Verfügung.

Tab.12 : Recovery-Versuch mit Ubichinon₅₀ bei Zusatz zu n-Heptan-extrahiertem Kalbsherz-Trockenpulver und Verseifung unter Pyrogallolschutz nach Crane (1).

NR	Ubichinon ₅₀ in 8/5g extrahierter Trockensubstanz		Wiedergefundene Menge		Abweichung in % (= d) vom arithmetischen Mittel
	ohne Zusatz	mit Zusatz 243	in	in %	
1	91,5	276	184,5	75,90	+ 5,45
2	90,5	255	164,5	67,70	- 2,75
		mit Zusatz 256,3			
3	125,7	308,4	182,7	71,20	+ 0,75
4	122,8	294,4	171,6	66,95	- 3,50
			Mittel: 70,45		

Abweichung des gefundenen arithmetischen Mittelwertes von der gegebenen Menge: - 29,55 %

Mittlere Abweichung einer Einzelbeobachtung vom Mittelwert:

$$S = \sqrt{\frac{d^2}{n-1}} = \underline{\underline{+ 4 \%}}$$

UV-Spektrum

Das UV-Spektrum der isolierten Fraktion stimmt mit dem Spektrum des authentischen Ubichinons₅₀ in Maximum, Minimum und isobestischen Punkten überein (Abb.15).

Infrarotspektrum

Das Infrarotspektrum der isolierten Fraktion (Abb.16b) besitzt alle Charakteristika des authentischen Ubichinons₅₀ (Firma Hoffmann-La Roche) (Abb 16a). Daneben zeigt die Probe aus Kalbsherz bei 5,75 μ ein Maximum, welches auf eine Carbonylgruppe hinweist. Aus dem Massenspektrum der Fraktion läßt sich entnehmen, daß diese Carbonylgruppe einer sehr niedermolekularen Verbindung angehören muß, die möglicherweise aus dem Lösungsmittel stammt.

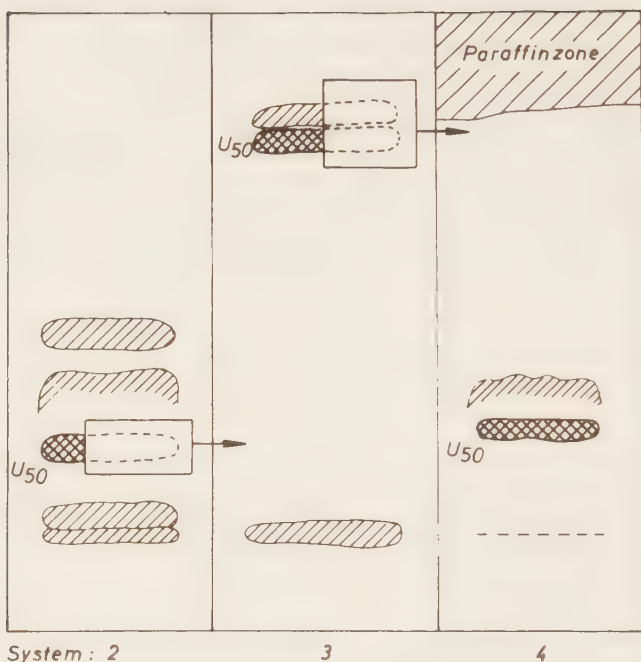


Abb. 13 : Chromatographische Auftrennung eines n-Heptan-Extraktes aus 400 mg Kalbsherz. Vorgereinigt auf System 1 (Tab. 7).
 Trennsysteme: siehe Legende zu Abb. 8

Massenspektrum

Weitere Hinweise zur Frage der Identität und Reinheit der aus Kalbsherz isolierten Fraktion lieferte die massenspektrometrische Untersuchung. *

*Für die Anfertigung der Massenspektren möchte ich Herrn Dr. Prox vom Institut für organische Chemie der Technischen Hochschule München (Direktor Prof. Weigand) und Herrn Dr. Schäfer (Max-Planck-Institut für Biochemie, München) sehr herzlich danken.



Abb.14 : Rechromatographie der aus Kalbsherzextrakt abgetrennten Ubichinonfraktion (Tab.7 u. Abb. 8).

Trennsysteme: siehe Legende zu Abb. 8 , System 2 nicht im Durchlauf.

a = authentisches Ubichinon₅₀.

KH = Ubichinon₅₀ aus Kalbsherz.

Aus Abb.17b ist zu entnehmen, daß ihre Zerfallscharakteristik in allen Einzelheiten mit der des authentischen Ubichinons₅₀ (Abb.17a) übereinstimmt. Das Molekulargewicht des Ubichinons₅₀ beträgt 862. Bei dieser Masseneinheit zeigt sich ein deutliches Signal. Interessanterweise findet sich bei 864 M.E. ein 2,5-fach stärkerer Peak, welcher von Hydrierungsprodukten des Ubichinons herrührt. Die Peaks bei 863 und 865 M.E. rühren hauptsächlich von Isotopen des Kohlenstoffs, aber auch von Produkten partieller Hydrierung des Ubichinons₅₀ her. Die Annahme, daß die Hydrierungsprodukte im Verlauf der massenspektrometrischen Messung entstanden sind, wird durch 3 Kriterien gestützt:

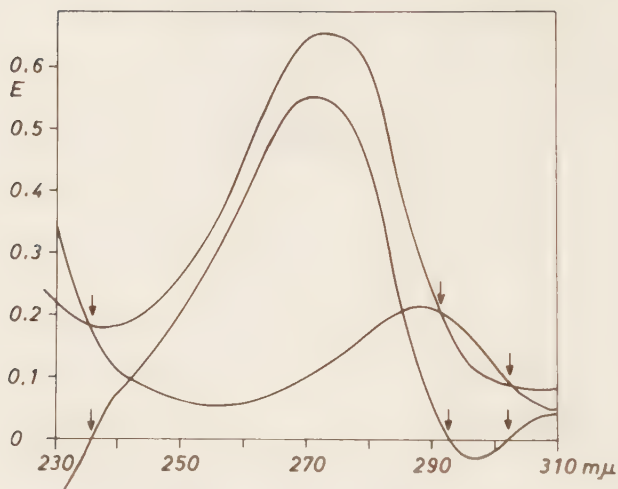


Abb. 15: UV-Spektrum von Ubichinon₅₀ aus Kalbsherz in absol. Äthylalkohol. Ubichinonkonzentration 43,8 n mol/ml. Absorpt.max. 272 mμ. Absorpt.min. 237mμ. Isosbestische Punkte: 236, 292, 302 mμ.

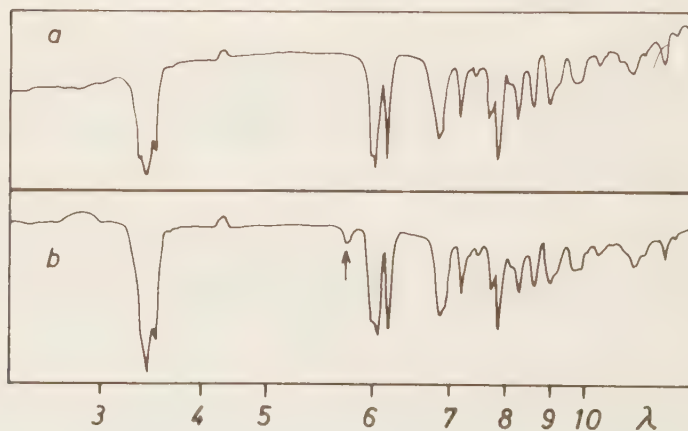


Abb. 16 : Infrarotspektren von Ubichinon₅₀.
a) Ubichinon₅₀ authentische Substanz (Fa.Hoffmann-La Roche)
b) Ubichinon₅₀ aus Kalbsherz.



Abb. 17: Massenspektrum von Ubichinon₅₀.
 A = authentische Substanz (Fä. Hoffmann-La Roche)
 B = Ubichinon₅₀ aus Kalbsherz
 C = Ubichinon₅₀ aus Froschherz

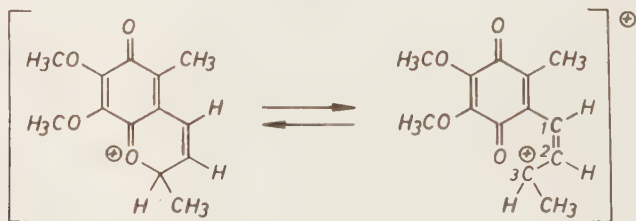
1. Die verwendeten Proben zeigen im UV-Spektrum keinen Hinweis auf einen Ubichinolgehalt (reduziertes Ubichinon s. Abb. 3).

2. Die Relation der Intensitäten von 862 : 864 M.E. verschiebt sich bei länger dauernder Messung zunehmend zugunsten des Peak von 864.

3. Gleichsam als Negativ zu der oben beschriebenen Signalgruppe erscheint zwischen 854 und 859 M.E. eine Gruppe, die den gleichzeitig entstehenden dehydrierten Verbindungen zuzuordnen ist.

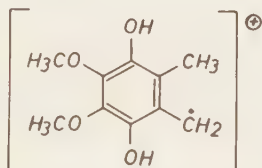
Von dem intensivsten Peak (864 M.E.) ausgehend kann die Abspaltung der Isoprenreste (67-68 M.E.) der Seitenkette verfolgt werden. Aufgrund der eben dargestellten Hydrierungs- und Dehydrierungsvorgänge, sowie durch das Vorhandensein von Isotopen des Kohlenstoffs ergibt sich auch hier jeweils eine charakteristische Gruppe von Signalen. Alle Intensitäten dieser Zerfallsreihe sind um den Faktor 10^{-2} geringer als die Signale um den Molekülpeak.

Die Verfolgung der Isoprenabspaltung gelingt bis zu n-8 Isopreneinheiten (322 M.E.). Das Fehlen des n-9 Isoprensignales (254 M.E.) und der starke Peak bei 235 M.E. sind auf eine gemeinsame Ursache zurückzuführen. Das Signal bei 235 M.E. dürfte von folgendem Bruchstück herrühren:



Der Bildung dieses Fragmentes muß die Verlagerung der Doppelbindung zwischen C_2 und C_3 der Seitenkette nach $C_1 - C_2$ vorausgehen. Dadurch wird die Bindung zwischen C_5 und C_6 der Seitenkette, also an der Grenze zwischen den Isopreneinheiten stabilisiert und es findet ein atypischer Zerfall statt.

Der weitere Zerfall des Fragmentes führt zu dem Bruchstück mit der Massenzahl 197. Hierbei handelt es sich um ein hydriertes Ubichinon mit lediglich einer CH_2 -Gruppe anstelle der Seitenkette.



Wie aus Abb. 17a und 17b ersichtlich ist, sind diese Zerfallscharakteristika in gleicher Weise an authentischem Ubichinon₅₀ und an dem Ubichinon₅₀ aus Kalbsherz, wie es nach der angegebenen Methode isoliert wurde, abzulesen. Verunreinigungen sind in dem höhermolekularen Bereich über 190 M.E. nicht feststellbar. Unterhalb dieser Massenzahl ist wegen einer Verunreinigung durch Lösungsmittel keine weitere Aufschlüsselung möglich.

Alle einschlägigen Untersuchungen zeigen somit übereinstimmend, daß die aus Kalbsherz isolierte Fraktion mit Ubichinon₅₀ identisch ist und einen 100%igen Reinheitsgrad besitzt. Dieser Reinheitsgrad war nur durch die Hintereinanderschaltung von vier Chromatographieschritten erreichbar.

3. Recovery-Versuch

Die quantitative Durchführbarkeit der modifizierten Ubichinonbestimmung wurde mit einem sog. Recovery-Versuch überprüft, d.h. es wurde untersucht, wieviel von 73,2 bzw. 55 μg authentischem Ubichinon₅₀, die zu 100 mg Gewebstrockenpulver zugesetzt wurden, zurückgewonnen werden, wenn sie den in Tab. 7 aufgeführten Analysengang durchlaufen. Aus Tab. 13 ist zu entnehmen, daß im Mittel 98,9 % der zugegebenen Menge wiedergefunden werden, wobei die mittlere Abweichung einer Einzelbeobachtung vom Mittelwert $\pm 2,5$ % beträgt.

Tab.13: Recovery von Ubichinon₅₀ bei Zusatz zu Kalbsherz-Trockenpulver. Analyse⁵⁰ s. Tab. 7 ; a u. b: Doppelbestimmung aus einer Charge.

NR	Ubichinon ₅₀				Abweichung in % (= d) vom arithmetischen Mittel	
	in 8/100 mg Tr.P.		Wiedergefundene Menge			
	ohne Zusatz	mit Zusatz 73,2		%		
1	a	54,2	125,0	70,8	96,7	- 2,2
	b	49,3	124,3	75,0	102,4	+ 3,5
2			mit Zusatz 55,2			
	a	77,4	131,3	53,9	97,6	- 1,3
	b	76,0	130,6	54,6	98,9	0,0
Mittel:				98,9		

Abweichung des gefundenen arithmetischen Mittelwertes von der gegebenen Menge: - 1,1 %

Mittlere Abweichung einer Einzelbeobachtung vom Mittelwert:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n - 1}} = \underline{\underline{\pm 2,5 \%}}$$

Alle aufgeführten Kriterien haben übereinstimmend den eindeutigen Beweis geliefert, daß die beschriebene Methode alle Forderungen für eine quantitative und spezifische Bestimmung von Ubichinon₅₀ in Gewebe erfüllt. Die spezifische Durchführbarkeit der Bestimmung beruht auf der vollständigen Abtrennung solcher Begleitstoffe, die das Analysenergebnis beeinflussen, sich aber nicht durch Verschiebung der isosbestischen Punkte zu erkennen geben. Aus Tab.14 ist zu entnehmen, daß es von derartigen Begleitstoffen solche gibt, die ein Zuviel an Ubichinon vortäuschen (A), weil sie bei dem Umsatz mit Kaliumborhydrid in dem einschlägigen Messbereich von 275 mμ ebenfalls eine Absorptionsabnahme zeigen. Es gibt aber auch Begleitstoffe mit völlig gegensätzlicher Wirkung (B) (siehe 45).

Tab.14 : Ergebnis der Ubichinonanalyse in Abhängigkeit vom Aufarbeitungsgang (Tab.7). (Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar).
n-Heptan-Extrakt: Äthanol-fällung.
Kalbsherz; A und B Material von verschiedenen Tieren.

Aufarbeitungs- gang	Ubichinon ₅₀ in g/g Tr.P.		Isosbestische Punkte (m _μ)		
	Expt. A	Expt. B			
n-Heptan-Extrakt	933	766	236	292	302
Säulenchromato- graphie System 1	908	717	236	292	302
Dünnschichtchro- matographie System 2	1012		236	292	302
System 3	1065		236	292	301
System 4	1023	674	236	292	301

Ergebnis der Ubichinonanalyse in Abhängigkeit vom Aufarbeitungs- gang.

Um störende Stoffe in dem Gewebeextrakt nachzuweisen, wurden Proben eines Extraktes aus Kalbsherztrockenpulver dem Trenngang für Ubichinon unterworfen und aliquote Mengen auf den verschiedenen Stufen der Reindarstellung einer quantitativen Messung und spektroskopischen Untersuchung zugeführt.

Durchführung des Versuchs

Aufarbeitung des Gewebes:

Ein Kalbsherz wurde sofort nach der Tötung des Tieres in Streifen zerschnitten und auf Eis gekühlt. Nach Abkühlung des Gewebes wurden Fascien und Fett abpräpariert, das Gewebe in kleine Stücke zerschnitten und im gekühlten Fleischwolf zerkleinert. Der Gewebsbrei (200 g) wurde nach Zusatz von etwa 1/2 Vol. eisgekühltem Phosphatpuffer pH 7,0 im Ultraturrax homogenisiert.

Das Gewebshomogenat wurde in flachen Petrischalen eingefroren und lyophilisiert. Die Trockenpulverproben zeigten bei Aufbewahrung im Vakuumexsiccator bei Zimmertemperatur, einem Druck von 50 Millitorr und Trockengel als wasserbindendem Mittel keinen Gewichtsverlust mehr.

Herstellung des Extraktes:

5 g Trockenpulver wurden 3mal mit je 50 ml n-Heptan 10 Minuten unter Ultraschalleinwirkung extrahiert, entsprechend der Beschreibung der Methodik zur Ubichinonanalyse. Der Gesamtextrakt wurde eingengt und ad 50 ml mit n-Heptan aufgefüllt, sodaß 1 ml der Lösung den Extrakt aus 100 mg Trockenpulver enthält.

Fraktionierung des Extraktes:

1. Fällung der Äthanolunlöslichen Fraktion:

2 ml Gesamtextrakt (entsprechend 200 mg Trockenpulver) wurden in Zentrifugenröhrchen im Stickstoffstrahl eingedampft, bis auf einen geringen Rückstand an Lösungsmittel. Es zeigte sich ein starker, weißer Niederschlag, welcher mit 2 ml Äthanol versetzt wurde. Nach Zentrifugation wurde der Äthanolüberstand entnommen, der Rückstand in 1 ml n-Heptan gelöst. Es erfolgte Zugabe von 1 ml Äthanol absolut und Kühlung auf Eis (20 Minuten). Nach Zentrifugation und Entnahme des Überstandes wurde die Behandlung des Niederschlages wiederholt. Die gesammelten Überstände wurden eingengt, mit Äthanol in 5 ml-Kolben überführt und zur Messung gebracht.

Durch Lösung des verbliebenen Äthanolunlöslichen Rückstandes in n-Heptan und Dünnschichtchromatographie im System 2 und 3 unter Vergleich mit authentischem Ubichinon₅₀ konnte ein Verlust an Ubichinon im Verlauf der Fällungsschritte ausgeschlossen werden. Abb. 18 zeigt das Ergebnis der Chromatographie. Es ist ersichtlich, daß keine dem Ubichinon₅₀ entsprechende Fraktion in dem Niederschlag nachzuweisen ist.

2. Chromatographische Auftrennung.

In einem Doppelversuch wurden je 10 ml des Extraktes entsprechend 1 g Trockenpulver einer Fraktionierung unterworfen. Nach jeder Stufe der Reinigung über die 4 Systeme wurde ein aliquoter Teil entnommen und für die Messung aufbewahrt.

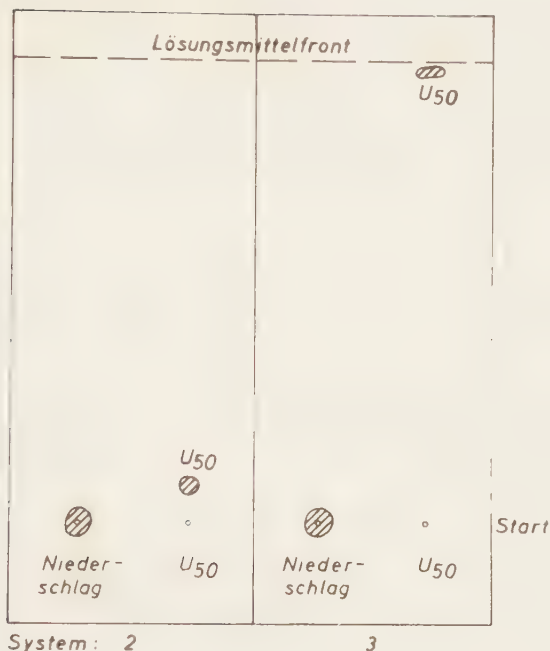


Abb. 18 : Chromatographie des Athanolniederschlages aus Kalbs-herz-n-Heptan-Extrakt. Vergleich mit authentischem Ubichinon. System 2: n-Heptan-Aceton 98:2; System 3: Benzol-Methanol 98:2. Sichtbarmachung der Fraktionen durch Besprühen mit konz. H_2SO_4 und 20 Min. Erhitzen auf $110^\circ C$.

Ergebnisse der Messung mit Kaliumborhydrid in Abhängigkeit vom Aufarbeitungsgang.

In Tab. 14 sind die Ergebnisse der quantitativen Ubichinonbestimmung auf den Stufen der Reinigung wiedergegeben. Es zeigt sich, daß in ungereinigten Extrakten Ubichinonwerte gemessen werden, die bis zu 10 % von den effektiven Ubichinonkonzentrationen unterschieden sind. Bei Experiment A ergab sich ein Anstieg der Ubichinonwerte im Verlauf der Reinigung, was auf die Abtrennung einer Verunreinigung schließen läßt, welche wie Ubichinon bei Reduktion mit Kaliumborhydrid eine Extinktionsabnahme zeigt.

Experiment B zeigte durch einen Abfall der Ubichinonmenge eine Verunreinigung an, die durch Zunahme der Extinktion bei Reduktion einen zu geringen Ubichinonwert vortäuscht. Die beiden gegensätzlichen Ergebnisse stehen in Einklang mit Angaben von Green (45), die an der Ratte gewonnen wurden. Aus der Tabelle geht weiter hervor, daß die Fehler der quantitativen Messung nicht mit einer Verschiebung der isosbestischen Punkte einhergehen.

In einem Experiment wurde untersucht, ob die Differenz der Ubichinonmessung zwischen System 1 und 2 von Experiment A (Tab.14) durch Abspaltung einer Fraktion im Verlauf der Chromatographie auf System 2 zustande kommt. Hierzu wurde in einer Doppelbestimmung ein n-Heptan-Extrakt aus 500 mg Trockenpulver derselben Kalbsherzaufarbeitung hergestellt und nach Säulenchromatographie (System 1) 90 Minuten im System 2 im Durchlauf chromatographiert. Um den Durchlauf des Lösungsmittels zu gewährleisten wurde in diesem Experiment der Oberrand der Chromatographieplatte zur Abdunstung durch eine schmale Öffnung außerhalb der Kammer geführt, sodaß die Gesamtheit der abgetrennten Substanzen aus der Platte zurückgewonnen werden konnten. Das Kieselgel der Platte wurde quantitativ in 2 Fraktionen entnommen und eluiert. Fraktion 1 war die Ubichinonfraktion, Fraktion 2 das Eluat des gesamten restlichen Kieselgels der Platte. Abb. 19 zeigt die Differenzspektren der isolierten Fraktion nach Reduktion der Referenzcuvette mit Kaliumborhydrid. Spektrum 1: Differenzspektrum der Ubichinonfraktion (Fraktion 1). Spektrum 2: Restfraktion (Fraktion 2). Spektrum 3: Rekombination der Fraktionen. Es zeigt sich, daß die Restfraktion unter den Bedingungen der KBH_4 -Reduktion eine Extinktionszunahme bewirkt. Bei Rekombination mit der Ubichinonfraktion bleibt die Verschiebung der isosbestischen Punkte jedoch unter $1 \text{ m}\mu$.

Dies ist ein weiterer Beweis für die Notwendigkeit, die Auftrennung des Ubichinons bis zur Reindarstellung durchzuführen.

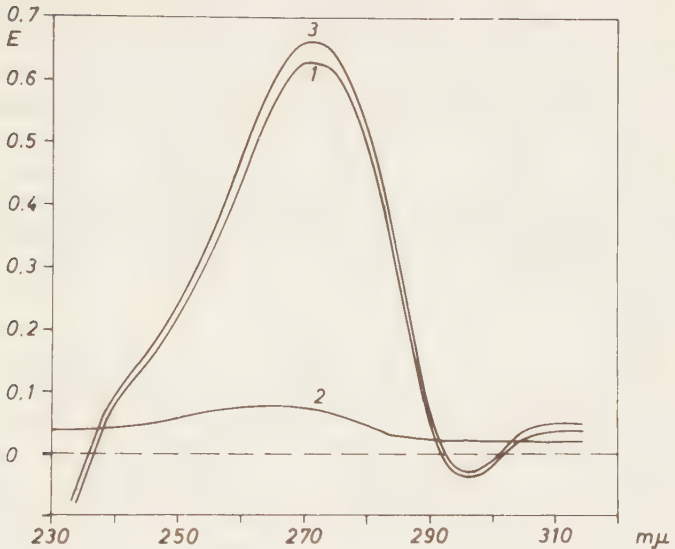


Abb. 19: UV-Differenzspektrum der aus System 2 isolierten Ubichinonfraktion und der in System 2 abgetrennten Restfraktion. Oxydierte gegen reduzierte Form. Gemessen in absolutem Äthylalkohol. Reduktion der Referenzcuvette mit 0,5 % wässriger KBH₃-Lösung (0,01 ml/ml Cuv.Inhalt). 1 = Ubichinonfraktion, 2 = Restfraktion, 3 = Rekombination. Konzentrationen: 1 u. 3 = Extrakt aus 200 mg Trockenpulver ad 5 ml. 2 = Extrakt aus 500 mg Trockenpulver ad 5 ml mit Äthylalkohol absolut.

Gehalt des Froschherzens an Ubichinon₅₀

Wie eingangs beschrieben, sollte festgestellt werden, in welchem Umfang sich die Konzentration der präformierten Chinone oder ihre intrazelluläre Verteilung ändert, wenn das perfundierte Froschherz in den Zustand der Hypodynamie gerät. In diesem Zustand konnte durch Zusatz bestimmter Chinone die Syntheserate der energiereichen Phosphate so weitgehend erhöht werden (41), daß die isometrische und isotonische Kontraktionsleistung signifikant steigt (40). Möglicherweise ist im Zustand der Hypodynamie des perfundierten Herzens die Konzentration der Chinone, die in der Atmungskette katalytische Funktionen besitzen auf einen limitierenden Betrag abgesunken, so daß eine

Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit eintreten kann, wenn das spezifisch wirksame Redoxsystem durch Zusatz ergänzt wird.

In die vorgesehene Chinonanalytik wurden zunächst die Ubichinone einbezogen. Zur Prüfung der Übertragbarkeit der in Tab.10 beschriebenen Methodik zur Reindarstellung von Ubichinon auf das Froschherz wurde das isolierte Ubichinon der massenspektrometrischen Reinheitsprüfung unterzogen. Wie Abb.17c zeigt, war das Ubichinon aus Froschherz völlig mit dem aus Kalbsherz isolierten, sowie dem authentischen Ubichinon der Firma Hoffmann-La Roche identisch.

Die Präparation der Froschherzen für die Ubichinonanalytik hielt sich an die von Dohrn (40) angegebene Methodik (s.S.22). Die Herzen wurden auf einer Straub'schen Kanüle 14 Stunden mit isotonomischer Tyrodelösung (pH 7,4) perfundiert, die Kontrollen jeweils nur 10 Minuten. Alle Herzen wurden nach Wollenberger (68) mit einer Kühlzange in flüssigem N₂ eingefroren, zermörsert und lyophilisiert. Für die Ubichinonanalyse wurde jeweils 100 mg Trockenpulver, ca. 5 Herzen eingesetzt. Stickstoffanalysen wurden nach Sobel, Yuska u. Cohen (43) mit je 5 mg Trockenpulver durchgeführt.

Aus Tab.15 ist zu entnehmen, daß der Gehalt an Ubichinon₅₀ in den Herzen ansteigt, wenn sie während einer 14-stündigen Perfusion in den Zustand der Hypodynamie geraten. Pro Gramm Stickstoff beträgt dieser Anstieg 12,7 %, ein Wert dessen Signifikanz statistisch gesichert ist. Die Berechnung der Analysenwerte auf die Stickstoffeinheit ist in diesem Fall notwendig, da die Herzen während der Perfusion so weitgehend an Betriebsstoffen verarmen, daß der Stickstoffgehalt relativ ansteigt (Tab.16).

Stickstoffanalyse des Perfusates

Durch Untersuchung des Perfusates konnte gezeigt werden, daß der Stickstoff als sichere Bezugsgröße zur Berechnung der Ubichinonkonzentration angesehen werden kann. Hierbei wurde geprüft, wie hoch der Stickstoffverlust einzelner Herzen während der Perfusion ist.

Tab. 15 : Gehalt normaler und hypodynamer Froschherzen an Ubichinon₅₀. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Für jede Einzelbestimmung wurden 100 mg Trockenpulver, ca. 5 Herzen eingesetzt.

NR	Froschherz		B in % von A
	Ubichinon ₅₀ in µMol/g N		
	<u>A</u> normaler Zustand	<u>B</u> hypodynamer Zustand	
1	4,58	5,27	+ 15,0
2	4,70	5,27	+ 12,1
3	4,53	4,99	+ 10,3
4	5,10	5,79	+ 13,5
Mittel	<u>M₂ = 4,73</u>	<u>M₁ = 5,33</u>	<u>M = + 12,7 %</u>

Signifikanz:

$$k = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\xi_1^2 + \xi_2^2}} = \underline{3,2}$$

Tab. 16 : Stickstoffgehalt von Froschherzen in normalem und hypodynamen Zustand (14-stündige Perfusion) in % des Trockenpulvers.

Stickstoff in % des Trockenpulvers			
Versuch NR	normaler Zustand	hypodynamer Zustand	%
1	10,2	11,2	+ 9,8
2	10,47	11,55	+ 10,2
3	10,73	11,73	+ 9,3
4	11,05	11,77	+ 6,5
Mittel:			+ 8,95

a) Recovery-Versuch mit Kreatin

Es war zunächst auszuschließen, daß die Stickstoffbestimmung durch Bestandteile der Tyrodelösung gestört wird. Hierzu wurden zu 200 ml Tyrodelösung 962,5 g Kreatin zugesetzt. Die Lösung wurde im Wasserstrahl-Vakuum eingeeengt und nach Kjeldahl (s.S. 24) analysiert.

Von dem eingesetzten Kreatin wurden bei 4 Versuchen im Mittel 97,6 % wiedergefunden (Tab. 17).

Tab. 17 : Recovery-Versuch mit Kreatin bei Zusatz zu 200 ml Tyrodelösung.

NR	Kreatin in g/200 ml			Abweichung in % (= d) vom arithmetischen Mittel
	eingesetzt	wiedergefunden g	%	
1	962,5	892,9	92,8	4,8
2	962,5	966,0	100,4	2,8
3	962,5	948,6	98,6	1,0
4	962,5	948,6	98,6	1,0
Mittel:			97,6	

Abweichung des gefundenen arithmetischen Mittelwertes von der gegebenen Menge: - 2,4 %

Mittlere Abweichung einer Einzelbeobachtung vom Mittelwert:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n - 1}} = \pm 3,3 \%$$

b) Analyse des Perfusates

Zur Stickstoffanalyse des Perfusates wurden 4 Herzen 16 Stunden perfundiert. Die Perfusionsflüssigkeit aus jedem der Herzen wurde getrennt aufgefangen und wie oben analysiert. Gleichzeitig wurden aus 2 Kanülen der Perfusionsapparatur Leerproben entnommen,

in denen ebenfalls die Kjeldahl-Analysen durchgeführt wurden. Diese Leerwerte wurden von den Werten des Perfusates abgezogen. Es ergab sich folgende Stickstoffausscheidung der untersuchten Herzen (Tab. 18):

Tab. 18 : Stickstoffanalyse im Perfusat von Froschherzen bei 16-stündiger Perfusion.

NR	Stickstoffausscheidung pro Herz in <i>g</i>
1	57,4
2	95,2
3	0
4	38,9
	Mittel: 48,0

Gleichzeitig wurde der durchschnittliche Stickstoffgehalt einzelner Froschherz-Ventrikel bestimmt. Hierzu wurden hypodyname Herzen nach Abtrennung der Vorhöfe als ganze Stücke mit der Kühlzange eingefroren und lyophilisiert (s.S. 58). Die Herzen wurden anschließend einzeln gewogen. Es ergab sich folgendes Trockengewicht:

Nr. 1)	23 mg
2)	25 mg
3)	16 mg
4)	19 mg
5)	21 mg
6)	18 mg
7)	<u>19 mg</u>

Mittel: 20,2 mg

Das mittlere Trockengewicht der Froschherz-Ventrikel betrug demnach 20 mg. In dem Trockengewebe der verwendeten Herzen (nach Zermörserung der gesamten Charge) wurde durch N-Bestimmung nach Kjeldahl 11,27 g% Stickstoff gefunden. Ein Froschherz enthält demnach ca. 2,25 mg Stickstoff. Durch Vergleich der Ergebnisse der Stickstoffanalyse des Perfusates und der Herzventrikel ergab sich, daß von der Gesamtmenge von 2,25 mg N nur ca. 48 g ausgeschieden werden. Dies entspricht einem Stickstoffverlust von 2,1 %.

Dies zeigt, daß in den Herzen die Bezugsgröße der Ubichinonbestimmung, der Stickstoffgehalt keiner Änderung unterworfen ist.

Einfluß von Ubichinon₅₀ und Ubichinon₃₀ auf die isotonische Kontraktion des hypodynamen Froschherzens

Der Anstieg der Ubichinonkonzentration im Verlauf der Perfusion stellte einen scheinbaren Widerspruch zu den Ergebnissen von Dohrn und Asbeck dar. Denn diese Befunde sind nur durch eine Konzentrationsverminderung der Chinone am Wirkort in den Mitochondrien erklärbar.

Die Erhöhung des Ubichinon₅₀-Gehaltes der hypodynamen Herzen wäre nur zu verstehen, wenn man annimmt, daß eine verstärkte Neusynthese während der Perfusion stattfindet. Dieses Phänomen beruht möglicherweise auf einer Änderung der intrazellulären Verteilung des Ubichinons, die während der Perfusion eintritt und im mitochondrialen Kompartiment, an den Reaktionsorten der Synthese des Chinons, seines Abbaues und auch seiner katalytischen Wirkung zu einer Konzentrationsverminderung führt.

Erste Beweise für diese Annahme erbrachten Befunde, die zeigen, daß durch Zusatz von Ubichinon₅₀ die isotonische Kontraktionsleistung des hypodynamen Herzens erheblich steigt, weil offensichtlich der Energiestoffwechsel katalytisch angeregt wurde.

Wurde dem hypodynamen Herzen bei einem Ermüdungswert von 42,1 % Fruktose (0,2 %ig) angeboten, so erfolgte im Verlauf von 2 Stunden eine Steigerung der Hubhöhe auf 51,7 % (s. Abb.20).

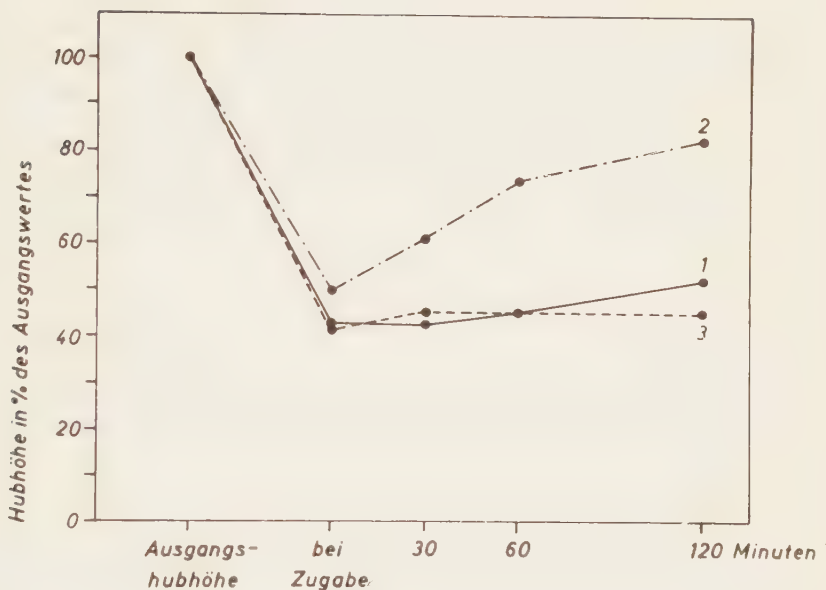


Abb. 20 : Verlauf der Reaktivierung des hypodynamen Froschherzens durch Fruktose (0,2 %), Ubichinon₅₀ ($1,3 \times 10^{-4}$ molar), Ubichinon₃₀ ($1,3 \times 10^{-4}$ molar). 1 = Fruktose; 2 = Fruktose+Ubichinon₅₀; 3 = Fruktose+Ubichinon₃₀.

Diese geringe Steigerung der Hubhöhe um 9,6 % war ebenso von Dohrn festgestellt worden.

Bei der Untersuchung von Ubichinon₅₀ in der Konzentration $1,3 \times 10^{-4}$ m (22 Versuche) ergaben sich zwei Arten der Reaktion. Bei einem Teil der hypodynamen Herzen (9 Versuche) war keine Steigerung der Hubhöhe zu erzielen. Dies ist wahrscheinlich auf schlechte Diffusionsverhältnisse in den Systemen zurückzuführen. Bei den übrigen 13 Herzen zeigte sich jedoch eine deutliche Steigerung der Hubhöhe. (Abb. 21). Der Ermüdungswert dieser Herzen betrug durchschnittlich 49,8 % und stieg im Verlauf von 2 Stunden auf 82,5 %. Dies entspricht einer Steigerung von 32,7 %.

Dieser Effekt des Ubichinons₅₀ ist von hoher Spezifität, er kann nicht mit Ubichinon₃₀ erzielt werden, einer homologen Verbindung,

die sich von der Ersteren nur durch das Fehlen von vier Isopreneinheiten in der Seitenkette unterscheidet.

Signifikanz der stat. Versuchsergebnisse

Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurden die nach 120 Minuten ermittelten Mittelwerte des Leistungszuwachses, ausgedrückt in % der Anfangshubhöhe miteinander verglichen und die entsprechenden Werte für die Konstante K nach der Formel

$$K = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\xi_1^2 + \xi_2^2}}$$

errechnet. (M_1 = Leistungszuwachs unter Ubichinon₅₀, M_2 = Leistungszuwachs unter Fruktose). Bei einigen Versuchen standen nur die Werte für 60 Min. zur Verfügung und wurden entsprechend in die Berechnung einbezogen.

Zur dieser Berechnung mußten noch die Werte:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}} \quad (\text{als Maß für die mittlere Abweichung der gefundenen Werte vom arithmetischen Mittel}) \text{ und}$$

$$\xi = \frac{\bar{\delta}}{\sqrt{n}} \quad (\text{für den mittleren Fehler der einzelnen Mittelwerte})$$

bestimmt werden.

Für σ und ξ wurden folgende Werte ermittelt:

$$\sigma_1 = 15,9 \quad \xi_1 = 4,25 \quad \sigma_2 = 10,3 \quad \xi_2 = 2,73$$

Für die Signifikante K ergab sich:

$$K = 4,9$$

=====

Die Werte für die Signifikante K liegen bei Ubichinon₅₀ über dem Signifikanzwert von 2,0 und sind also statistisch gesichert.

Es gibt eine Reihe von Stoffen, die am Herzen eine positiv-inotrope Wirkung entfalten. Insbesondere sind es verschiedene Pharmaka (z.B. die Herzglykoside), die aufgrund bisher unbekannter Mechanismen die Kontraktionskraft des Herzens steigern. Aber auch physiologische Substanzen wie Adrenalin vermögen im Rahmen der ergotropen Reaktion des Organismus das Herz zu einer vermehrten Leistung zu veranlassen. Diesen Substanzen ist gemeinsam, daß ihre Wirkung, wenn auch zum Teil schwächer, auch am frischen Herzen beobachtet werden kann.

Im Gegensatz dazu ist die Wirkung aller untersuchten Chinone nur am hypodynamen System, nicht aber im normalen Zustand zu erreichen.

Dies zeigt, daß der Effekt auf der Substitution des Stoffes am Wirkort beruht, wo durch Konzentrationsverminderung ein Mangel des Katalysators eingetreten ist und weist auf eine katalytische Wirkung im Energiestoffwechsel hin.

Die hohe Spezifität, die sich bei dem Vergleich der Wirkung von Ubichinon₅₀ und Ubichinon₃₀ (s. Abb. 20) zeigt, beweist die gute Verwendbarkeit des überlebenden Systems zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Struktur und Wirkung im Bereich der biogenen Chinone.

Darüberhinaus bieten diese Ergebnisse den ersten direkten Hinweis für die Teilnahme des Ubichinons₅₀ bei der oxydativen Phosphorylierung. Die Möglichkeit einer solchen Funktion war zwar bereits mehrfach erörtert worden (77, 78), besonders im Zusammenhang mit den Theorien über die Zwischenträgerfunktion der Chinolphosphate (34 a). Experimentelle Ergebnisse schienen jedoch gegen die direkte Beteiligung des Ubichinons an der oxydativen Phosphorylierung zu sprechen (35). Die hier beschriebene positiv-inotrope Wirkung, die spezifisch mit Ubichinon₅₀, nicht aber mit Ubichinon₃₀ erzielt werden konnte, zeigt jedoch eine gute Übereinstimmung mit den bei Vitamin K gefundenen Verhältnissen.

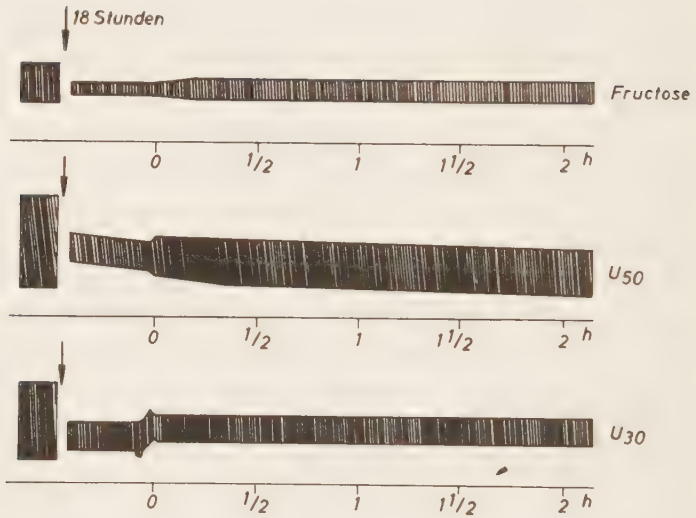


Abb.21 : Wiedergabe von Originalkymogrammen. Wirkung von Ubichinon₅₀ im Vergleich mit Fructose und Ubichinon₃₀ auf das hypodyname Froschherz.

DISKUSSION

=====

Obwohl seit den Arbeiten von Martius (9, 11) und seit der Entdeckung des Ubichinons durch Morton (19) und Crane (20) die zentrale Rolle dieser Chinone als enzymatische Cofaktoren der oxydativen Phosphorylierung und des Elektronentransports postuliert worden ist, konnten aus den diesbezüglichen Untersuchungen noch keine gesicherten Erkenntnisse hervorgehen. Um die Funktion der biogenen Chinone zu untersuchen, muß es nämlich gelingen, ihre Konzentration an dem Wirkort in den Mitochondrien auf einen limitierenden Betrag zu senken, ohne den komplizierten Aufbau dieser Strukturen zu verändern. Dies ist nicht möglich durch chemische und physikalische Methoden wie Lösungsmittlextraktion der Partikel (21, 22, 23) oder Disintegration der Enzymsysteme (4, 5), da hierbei unkontrollierbare Veränderungen an den mitochondrialen Strukturen hervorrufen werden.

Als optimales Testobjekt bieten sich hierzu dagegen überlebende Organe an. In diesen, von den Reservoirs des übrigen Organismus abgeschnittenen Systemen laufen eine Reihe von Vorgängen ab, die insgesamt zu einer Konzentrationsverminderung der Chinone am Wirkort führen. Wie die Untersuchungen am Ubichinon₅₀ gezeigt haben, dürfte es sich hierbei weniger um einen Abbau oder einen Verlust an das Perfusionsmilieu, als vielmehr um eine Neuverteilung innerhalb der verschiedenen Zellkompartimente handeln. Das überlebende System ist offenbar bestrebt, den Verlust der Chinone am Wirkort durch eine verstärkte Synthese aus bisher unbekannten Vorstufen zu kompensieren.

Es dürften sich daher, neben der ursprünglichen Zielsetzung, die auf die Untersuchung der Wirkungsspezifität der Chinone im Energiestoffwechsel gerichtet war, die Möglichkeit ergeben, Einblick in den Metabolismus der Chinone zu bekommen. Hierzu gehört die Frage, aus welchen Vorstufen die Stoffe aufgebaut werden und über welche Stufen der Abbau verläuft.

Für die Untersuchung der Wirkungsspezifität der biogenen Chinone dagegen ist es nicht wesentlich, auf welche Weise es zu einer Konzentrationsverminderung am Wirkort kommt. Es muß nur

gesichert sein, daß die experimentell erwünschte Funktionseinschränkung des Systems nicht durch strukturelle Veränderungen hervorgerufen wird. Dies ist durch die morphologischen Befunde und die physiologischen Tests von Asbeck (41) für das hypodryne Froschherz bereits nachgewiesen.

Für alle Aussagen über die Rolle der Chinone in der Atmungskette und oxydativen Phosphorylierung wird bisher gefordert, daß sie in Einklang stehen mit den Kriterien, die von Slater (10) für die diesbezügliche Funktion aufgestellt wurden. Es erscheint jedoch angebracht hier einige Einschränkungen zu machen. Diese betreffen das erste Kriterium von Slater:

"The component must be present in amounts commensurate with the enzyme activity."

Es läßt sich aus dieser Forderung nämlich nicht ableiten, wie hoch die Konzentration eines Chinones wirklich sein muß. Ein Stoff kann an einem enzymatischen Vorgang in verschiedener Weise teilnehmen und diesen verschiedenen Arten entsprechend verschiedene Konzentrationen, in denen er benötigt wird.

Aus der Betrachtung des glykolytischen Systems ist die interessante Tatsache bekannt, daß der Leloir-Ester (1,3-Diphospho-Glycerat) katalytische Funktionen ausübt, obwohl er in so niedriger Konzentration vorliegt, daß seine chemische Erfassung unter normalen Bedingungen unmöglich ist. Dies resultiert aus der Gleichgewichtslage der beteiligten Enzymreaktionen, die so eingestellt ist, daß die Stufe des 1,3-Diphospho-Glycerates sehr schnell durchlaufen wird.

Für die Chinone läßt sich daraus ableiten, daß sie trotz der sehr unterschiedlichen Konzentrationen, in denen sie in den Mitochondrien vorliegen, an den Vorgängen des Energiestoffwechsels teilnehmen können.

Die Theorie der schnell beweglichen "Shuttle-Molecules" (Green (4)) bietet z.B. ein Denkmodell, nach welchem erklärbar wäre, warum das energieliefernde System mit einer so geringen Menge an Vitamin K auskommt.

Es ist andererseits durchaus denkbar, daß durch die gleichzeitige Verminderung verschiedener Cofaktoren der Atmungskette doch eine Limitierung des Gesamt-Durchsatzes hervorgerufen wird. Wenn es nun gelingt, durch Substitution von Stoffen eine Erhöhung der Aktivität des Systems zu erreichen, so ist dies nur im Rahmen eines spezifischen Eingriffes in einzelne Reaktionsschritte möglich. Daher lassen sich aus den beschriebenen Substitutionsversuchen sichere Aussagen über die Wirkungsspezifität der Chinone in der Atmungskette und oxydativen Phosphorylierung ableiten.

Die Verwendung überlebender, chinonverarmter Organe zur Untersuchung der Wirkungsspezifität biogener Chinone bietet gegenüber den Arbeiten mit lösungsmittlextrahierten Partikeln (21, 22, 23, 26) die Möglichkeit, katalytische Funktionen der untersuchten Stoffe von strukturaufbauenden und -erhaltenden Wirkungen zu unterscheiden. Unspezifische Nebeneffekte, die die lipidartigen Chinone an vorgeschädigten (lösungsmittlextrahierten) Partikeln entfalten, können am überlebenden Organ nicht auftreten. Der beste Beweis ist die starke positiv-inotrope Wirkung, die Ubichinon₅₀ am hypodynamen Froschherzen entfaltet, die aber nicht durch das strukturell ähnliche Ubichinon₃₀ zu erzielen ist, welches sich nur durch die etwas kürzere Isoprenseitenkette unterscheidet.

ZUSAMMENFASSUNG

=====

Es wurde eine Methode zur Ubichinonanalyse in tierischem Gewebe erarbeitet. Sie gestattet im Gegensatz zu früheren Arbeitsweisen eine quantitative Extraktion von Ubichinon₅₀ ohne Verseifung des Gewebes. Da in den ungereinigten Lipidextrakten aus Kalbsherz Stoffe nachgewiesen wurden, die die quantitative Bestimmung mit Borhydrid stören, sich aber nicht in einer Verschiebung der isosbestischen Punkte des Ubichinons zu erkennen geben, wurde ein Auftrennungsgang von 4 Stufen (eine Säulenchromatographie und 3 Dünnschichtchromatographieschritte) erarbeitet, der es ermöglicht, Ubichinon₅₀ so weitgehend von allen Begleitstoffen abzutrennen, daß alle Reinheitskriterien der Rechromatographie, Infrarotspektroskopie und Massenspektrometrie erfüllt sind. Dies ermöglicht eine spezifische und quantitative Bestimmung von Ubichinon, deren Ergebnis durch keine störenden Begleitstoffe verfälscht sein kann.

Mit Hilfe der neu erarbeiteten Methode konnte gezeigt werden, daß der Gehalt der Froschherzen an Ubichinon₅₀, bezogen auf den Stickstoffgehalt, im Verlaufe der Perfusion um 12,7 % ansteigt. Aus den erhaltenen Messwerten für die Ubichinonkonzentration ergab sich eine Signifikanzkonstante von $K = 4,9$. Gleichzeitig wurde gefunden, daß Ubichinon₅₀ die Kontraktionskraft des hypodynamen Herzens im Sinne eines positiv-inotropen Effektes steigert. Dieser Effekt ist nicht durch Ubichinon₃₀ zu erzielen. Es wird daraus geschlossen, daß Ubichinon₅₀ durch eine Neuverteilung innerhalb der Zellkompartimente des hypodynamen Systems am Wirkort in seiner Konzentration abnimmt und daß dadurch möglicherweise eine Neusynthese von Ubichinon₅₀ veranlaßt wird.

Das hypodynamie Froschherz eignet sich daher einerseits zu Substitutionsversuchen im Rahmen der Frage der Wirkungsspezifität biogener Chinone und andererseits zum Studium von Biosynthese und Metabolismus von Chinonsystemen.

LITERATURVERZEICHNIS

=====

- (1) J. Monod u. M. Cohn
Advances in Enzymology 13, 67 (1952)
- (2) A.L. Lehninger
The Mitochondrion W.A. Benjamin Inc. New York 1963
- (3) A.L. Lehninger
pers. Mitteilung
- (4) D.E. Green u. A. Tzagoloff
Arch of Biochemistry u. Biophysics 116, 293 (1966)
- (5) D.E. Green
Konfer. Ges. deutsch. Naturforscher u. Ärzte, Rottach-Egern
1962, Springer-Verlag, Berlin, S. 86 (1963)
- (6) Ch. L. Wadkins u. A.L. Lehninger
J. Biol. Chem. 233, 1589 (1958)
- (7) Ch.L. Wadkins u. A.L. Lehninger
J. Biol. Chem. 234, 681 (1959)
- (8) S. Jshikawa u. A.L. Lehninger
J. Biol. Chem. 237, 2401 (1962)
- (9) C. Martius u. D. Nitz-Litzow
Biochim. Biophys. Acta 13, 152 (1954)
- (10) E.C. Slater
Advances in Enzymology 20, 147 (1958)
- (11) C. Martius
Angew. Chemie 73, 591 (1961)
- (12) J. Victor
Amer. J. Physiol. 108, 229 (1934)
- (13) O.B. Houchin u. H.A. Mattill
J. Biol. Chem. 146, 301, 309, 313 (1942)
- (14) C. Martius
Proc. III, Internat. Congr. of Biochem. S. 1 Brüssel 1955
- (15) C. Martius u. D. Nitz-Litzow
Biochim. Biophys. Acta 13, 289 (1954)
- (16) C. Martius u. D. Strufe
Biochem. Z. 326, 24 (1954)
- (17) F.L. Crane
Ciba Foundation symp. on quinones in electron transport,
Churchill, Ltd., London S. 322, 1961

- (18) C. Martius u. D. Strufe
Biochem. Z. 326, 24 (1954)
Golpa-Boonstra, J.P. u. E.C. Slater
Biochim. Biophys. Acta 22, 222 (1957)
Biochim. Biophys. Acta 27, 122 (1958)
- (19) R.A. Morton
Nature 182, 1764 (1958)
- (20) R.L. Lester, Y. Hatefi, C. Widmer u. F.L. Crane
Biochim. Biophys. Acta 33, 169 (1959)
- (21) L. Szarkowska
Arch. of Biochemistry u. Biophysics 113, 519 (1966)
- (22) F.L. Crane
Biochim. Biophys. Acta 31, 476 (1959)
- (23) F. Weber, U. Gloor u. O. Wiss
Helv. Chim. Acta 41, 1046 (1958)
- (24) F. Weber, U. Gloor u. O. Wiss
Helv. Chim. Acta 41, 1038 (1958)
- (25) E.R. Redfearn u. A.M. Pumphrey
Biochim. Biophys. Acta 30, 437 (1958)
- (26) F.L. Crane
Plant Physiology 34, 546 (1959)
- (27) R.L. Lester u. S. Fleischer
Arch. of Biochemistry u. Biophysics 80, 470 (1959)
- (28) G.V. Marinetti, J. Erbland, M. Morrison u. E. Stotz
J. Am. chem. Soc. 80, 402 (1958)
- (29) B. Chance
Ciba Foundation symp. on quinones in electron transport,
Churchill, Ltd., London, S. 327, 1961
- (30) M. Klingenberg u. L. Szarkowska
Biochem. Z. 328, 674 (1963)
- (31) A. Kröger u. M. Klingenberg
Biochem. Z. 344, 317 (1966)
- (32) A. Nason u. J.R. Lehmann
J. Biol. Chem. 222, 497 (1956)
- (33) A. Nason u. J.R. Lehmann
J. Biol. Chem. 222, 511 (1956)
- (34) E.C. Slater
Proc. of the Fourth Internat. Congr. of Biochemistry
Wien 1958 Vo. XI, S. 316
- (34a) M. Vilkas u. E. Lederer
Experientia 18, 546 (1963)

- (35) A.Kröger
Dissertation Marburg 1965
- (36) A.F. Brodie, B.R. Davis
Fed. Proc. 18, 778 (1959)
- (37) T.H. Wieland u. F. Pattermann
Angew. Chem. 70, 313 (1958)
- (38) V.M. Clark, D.W. Hutchinson, G.W. Kirby u. A. Todd
J. Chem. Soc. 715 (1961)
- (39) V.M. Clark, D.W. Hutchinson u. A. Todd
J. Chem. Soc. 722 (1961)
- (40) P. Dohrn
Dissertation München 1959
- (41) F. Asbeck
Dissertation München 1965
- (42) M. Billeter u. C. Martius
Biochem. Z. 334, 304 (1961)
- (43) A.E. Sobel, H. Yuska, J. Cohen
J. Biol. Chem. 118, 443 (1937)
- (44) F.L. Crane
Meth. of Bioch. Anal. 11, 279-306 (1963)
- (45) A.T. Diplock, J. Green, E.E. Edwin u. J. Bunyan
Biochem. J. 76, 563 (1960)
- (46) A.M. Pumphrey u. E.R. Redfearn
Biochem. J. 76, 61 (1960)
- (47) R.A. Morton
Ciba Foundation symp. on quinones in electron transport
Churchill, Ltd., London S. 5, 1961
- (48) Report of the Vitamin E.-Panel in Analyst. 84, 356 (1959)
- (49) M. Kofler
in "Festschrift Emil Christoph Borell"
Hoffmann-La Roche, Basel 1946 S. 199
- (50) M. Kofler, A. Langemann, R. Ruegg, L.H. Chopard-dit-Jean,
A. Rayroud u. O. Isler
Helv. chim. Acta 42, 1283 (1959)
M. Kofler, A. Langemann, R. Ruegg, U. Gloor, U. Schwieter,
J. Wüsch, O. Wiss u. O. Isler
Helv. chim. Acta 42, 2252 (1959)
- (51) U. Gloor u. O. Wiss
Biochem. Biophys. Research Commun 2, 222 (1960)

- (52) D.H.L. Bishop, K.P. Pandya u. H.K. King
Biochem. J. 83, 606 (1962)
- (53) P.H. Gale, B.H. Arison, N.R. Trenner, A.C. Page jr.
u. K. Folkers
Biochemistry 2, 196 (1963)
- (54) R.L. Lster u. T. Ramasarma
J. Biol. Chem. 234, 672 (1959)
- (55) B.O. Linn, A.C. Page jr., E.C. Wong, P.H. Gale, C.H. Shunk
u. K. Folkers
J. Am. chem. Soc. 81, 4007 (1959)
- (56) C. Martius
Biochem. Z. 327, 407 (1956)
- (57) B.H. Wagner, L. Hörhammer, B. Dengler
J. Chromatography 7, 211 (1962)
- (58) P. Bollinger
in E. Stahl Dünnschichtchromatographie (siehe (59))
- (59) E. Stahl
Dünnschichtchromatographie Springer-Verlag 1962
- (60) Ewing, Tomkins u. Kamm
J. Biol. Chem. 147, 233 (1943)
- (61) E.B. Hershberg, J.K. Wolfe, L.F. Fieser
J. Am. chem. 62, 3516 (1940)
- (62) J. Scudi u. R. Buhs
J. Biol. Chem. 141, 451 (1941)
- (63) R.H. Thompson
Naturally Occuring Quinones Acad. Press New York 1957 S.147
- (64) M. Dam, J. Glavind
Biochem. J. 32, 1018 (1938)
- (65) M. Dam, J. Kruse, E. Søndergard
Acta phys. Scand. 22, 238 (1950)
- (66) R. Craven
J. chem. Soc. 1605 (1931)
- (67) A. Emmerie u. Chr. Engel
Rec. Trav. chim. 57, 1351 (1938)
- (68) A. Wollenberger, O. Ristau u. G. Schoffa
Pflügers Arch. 270, 399 (1960)
- (69) E. Lehnartz, B. Flaschenträger
Phys. Chemie Bd. II/2b 208 (1957)

- (70) E. Lehnartz
Phys. Chemie Bd. II 225 (1959)
- (71) J.P. Green, E. Søndergaard, H. Dam
Biochim. Biophys. Acta 19, 182 (1956)
- (72) D.H.L. Bishop, H.K. King
Bioch. J. 85, 550 (1962)
- (73) V.C. Joshi, J. Jayaraman, T. Ramasarma
Bioch. J. 88, 25 (1963)
- (74) R.A. Morton
Vit. and Hormons 19, 19 (1961)
- (75) P.H. Gale, R.E. Erichson, A.C. Page u. K. Folkers
Arch. of Biochem. and Biophys. 104, 169 (1964)
- (76) K. Pandya, D.H.L. Bishop, H.K. King
Bioch. J. 78, 35p (1961)
- (77) V.M. Clark
Nature 181, 1650 (1958)
- (78) I. Chmielewska
Biochim. Biophys. Acta 39, 170 (1960)

Lebenslauf

Am 6. Februar 1940 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Otto Schottdorf und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Labs in Berlin geboren. Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Augsburg, anschließend das Realgymnasium Augsburg, wo ich im Jahre 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Im Winter 1959/60 begann ich das Medizinstudium an der Universität München, wo ich im Wintersemester 1961/62 die med. Vorprüfung bestand. Im Oktober 1962 begann ich am Phys. Chem. Institut der Universität München unter Leitung von Priv. Doz. Dr. E. Meyer mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Die medizinische Staatsprüfung legte ich im Frühjahr 1965 ab. Von Juni bis August 1965 arbeitete ich im Westkrankenhaus Augsburg 3 Monate als Medizinalassistent. Seit September 1965 bin ich weiterhin am Phys. Chem. Institut der Universität München beschäftigt.



